

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-232883  
(43)Date of publication of application : 29.08.2000

(51)Int.Cl.

C12N 15/09  
C12M 1/00  
C12Q 1/68  
G01N 21/78  
G01N 33/50

(21)Application number : 2000-025187  
(22)Date of filing : 02.02.2000

(71)Applicant : VYSIS INC  
(72)Inventor : BAO YIJIA  
CHE DIPING  
LI WAN-LIANG  
MUELLER UWE RICHARD  
SEELIG STEVEN A  
SHI JUFANG

(30)Priority

Priority number : 99 243067    Priority date : 02.02.1999    Priority country : US

## (54) GENE EXPRESSION USING NUCLEIC ACID MICROALLEY AND SIMULTANEOUS MEASUREMENT OF GENOMIC ABERRATION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To simultaneously measure a gene expression and a genomic aberration by using a solid bound nucleic acid target element, a first marker labeled tissue mRNA or the like, a second marker labeled tissue chromosomal DNA sample and a third marker labeled control nucleic acid.

SOLUTION: This measurement is a method for simultaneously detecting the gene expression and chromosomal aberration in a tissue sample and the alley of a nucleic acid target element linked with a solid support is provided. Hereupon, this nucleic acid target element contains a polynucleotide sequence substantially complementary to a nucleic acid showing the gene expression and chromosomal sequence in the tissue sample under a previously selected hybridization condition and provides at least three kinds of nucleic acid groups, namely a mRNA or cDNA group which is labeled with a first marker and originates in the tissue sample, a chromosomal DNA group which is labeled with a second marker and originates in the tissue sample and a control nucleic acid group labeled with a third marker. By carrying out hybridization between the alley and labeled groups, the kind and the intensity of the marker in plural target elements are detected.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or

application converted registration]  
[Date of final disposal for application]  
[Patent number]  
[Date of registration]  
[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]  
[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]  
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

## 書誌

- (19)【発行国】日本国特許庁(JP)  
(12)【公報種別】公開特許公報(A)  
(11)【公開番号】特開2000-232883(P2000-232883A)  
(43)【公開日】平成12年8月29日(2000. 8. 29)  
(54)【発明の名称】核酸マイクロアレイを用いる遺伝子発現およびゲノム異常の同時測定  
(51)【国際特許分類第7版】

C12N 15/09  
C12M 1/00  
C12Q 1/68  
G01N 21/78  
33/50

## 【FI】

C12N 15/00	A
C12M 1/00	A
C12Q 1/68	A
G01N 21/78	C
33/50	P

【審査請求】未請求

【請求項の数】78

【出願形態】OL

【全頁数】35

(21)【出願番号】特願2000-25187(P2000-25187)

(22)【出願日】平成12年2月2日(2000. 2. 2)

(31)【優先権主張番号】09/243067

(32)【優先日】平成11年2月2日(1999. 2. 2)

(33)【優先権主張国】米国(US)

(71)【出願人】

【識別番号】597060357

【氏名又は名称】ヴァイシス・インコーポレーテッド

【氏名又は名称原語表記】VYSIS, INC.

【住所又は居所】アメリカ合衆国イリノイ州60515-5400, ダウナーズ・グローヴ, ウッドクリーク・ドライヴ 3100

【住所又は居所原語表記】3100 Woodcreek Drive, Downers Grove, Illinois 60515-5400, United States of America

(72)【発明者】

【氏名】イジア・バオ

【住所又は居所】アメリカ合衆国イリノイ州60564, ネイパービル, ウィッシング・ウェル・レーン 1128

(72)【発明者】

【氏名】ディピン・チェ

【住所又は居所】アメリカ合衆国イリノイ州60559, ウェストモント, デミング・プレイス 217

(72)【発明者】

【氏名】ワン・リアン・リ

【住所又は居所】アメリカ合衆国イリノイ州60532, ライル, パークスレグ・コート 6415

(72)【発明者】

【氏名】ウーベ・リヒャルト・ミュラー

【住所又は居所】アメリカ合衆国イリノイ州60545, プラノ, リバー・ロード 11714

(72)【発明者】

【氏名】スティーブン・エイ・シーリング

【住所又は居所】アメリカ合衆国イリノイ州60565, ネイパービル, フォックスクロフト 19, アパートメント 119

(72)【発明者】

【氏名】ジュファン・シ

【住所又は居所】アメリカ合衆国イリノイ州60522, ヒンズデール, ワシントン・ストリート 5719

(74)【代理人】

【識別番号】100089705

【弁理士】

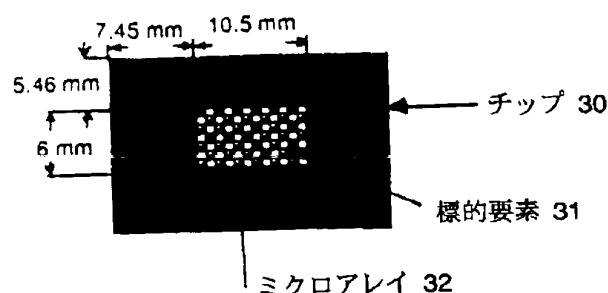
【氏名又は名称】社本 一夫 (外5名)

## 要約

(57)【要約】

【課題】核酸マイクロアレイを用いる遺伝子発現およびゲノム異常の同時測定を提供すること。

【解決手段】本発明は、組織試料中の遺伝子発現および染色体異常両方の同時検出のための、固体支持体に結合した核酸標的要素のアレイを用いる多色比較用ハイブリダイゼーション検定法を含む。本発明の方法は、第一蛍光色で標識された組織mRNAまたはcDNA試料、第二蛍光色で標識された組織染色体DNA試料、および第三蛍光色で標識された少なくとも一つの対照核酸のアレイへの比較用ハイブリダイゼーションを用いる。少なくとも二つの標的要素それぞれの蛍光色存在および強度を検出し、そして(i)第一および第三色の、および(ii)第二および第三色の蛍光比を測定する。このようにして、遺伝子発現および染色体異常を同時に検出する。



## 請求の範囲

【特許請求の範囲】

【請求項1】組織試料中の遺伝子発現および染色体異常の同時検出方法であって、(a)固体支持体に結合した核酸標的要素のアレイを提供し、ここにおいて、該核酸標的要素は、組織試料の遺伝子発現および染色体配列を示す核酸に予め選択されたハイブリダイゼーション条件下で実質的に相補的なポリヌクレオチド配列を含み;

(b)少なくとも3種類の標識された核酸集団、(i)第一マーカーで標識され且つ組織試料に由来するmRNAまたはcDNA集団、(ii)第二マーカーで標識され且つ組織試料に由来する染色体DNA集団、および(iii)第三マーカーで標識された少なくとも一つの対照核酸集団を提供し;

(c)該アレイと該標識された核酸集団とをハイブリダイゼーション条件下で接触させ;そして(d)少なくとも2種類の標的要素への第一、第二および第三マーカーそれぞれの存在および強度を検出することを含む上記方法。

【請求項2】前記標的要素がゲノムDNAを含む請求項1に記載の方法。

【請求項3】前記標的要素がcDNAを含む請求項1に記載の方法。

【請求項4】前記組織試料がヒトに由来する請求項1に記載の方法。

【請求項5】前記アレイがcDNAおよびゲノムDNA標的要素を含む請求項1に記載の方法。

【請求項6】前記アレイが、標的要素を100-10,000個の標的要素/平方センチメートルの範囲の密度で含む請求項1に記載の方法。

【請求項7】第一、第二および第三マーカーが、それぞれ異なった蛍光標識を含む請求項1に記載の方法。

- 【請求項8】検出工程(c)からのデータをプログラム化された計算機で処理し、そのままのおよび処理されたデータをデータベース中に記憶し、そしてそのままのおよび処理されたデータを表示することを更に含む請求項1に記載の方法。
- 【請求項9】未標識の保護核酸の添加を更に含む請求項1に記載の方法。
- 【請求項10】ヒトの療法の選択における上記方法に由来するデータの使用を更に含む請求項4に記載の方法。
- 【請求項11】それぞれの標的要素で(i)第一色および第三色間の(ii)第二色および第三色間の蛍光比を測定することを更に含む請求項1に記載の方法。
- 【請求項12】前記組織が細胞系試料を含む請求項1に記載の方法。
- 【請求項13】前記組織試料が1種類の細胞を含む請求項1に記載の方法。
- 【請求項14】前記組織試料がヒト腫瘍試料を含む請求項1に記載の方法。
- 【請求項15】前記組織試料が血液細胞を含む請求項1に記載の方法。
- 【請求項16】前記ゲノムDNAが、20kb-250kbの範囲の複雑度を有するヒトゲノムDNAを含む請求項2に記載の方法。
- 【請求項17】前記cDNAが、100bp-5,000bpの範囲の複雑度を有するcDNAを含む請求項3に記載の方法。
- 【請求項18】前記標的核酸要素が少なくとも一つのペプチド核酸を含む請求項1に記載の方法。
- 【請求項19】前記方法を中規模装置で行なう請求項1に記載の方法。
- 【請求項20】組織試料中の遺伝子発現および染色体異常の同時検出方法であって、(a)固体支持体に結合したゲノムDNAを含む核酸標的要素のアレイを提供し、ここにおいて、該核酸標的要素は、組織試料の遺伝子発現および染色体配列を示す核酸に予め選択されたハイブリダイゼーション条件下で実質的に相補的なポリヌクレオチド配列を含み;
- (b)少なくとも3種類の標識された核酸集団、(i)第一蛍光色で標識され且つ組織試料に由来するmRNAまたはcDNA集団、(ii)第二蛍光色で標識され且つ組織試料に由来する染色体DNA集団、および(iii)第三蛍光色で標識された少なくとも一つの対照核酸集団を提供し;
- (c)該アレイと該標識された核酸集団とをハイブリダイゼーション条件下で接触させ;そして(d)少なくとも2種類の標的要素での第一、第二および第三蛍光色それぞれの存在および強度を検出することを含む上記方法。
- 【請求項21】前記アレイが、基体の平面上に少なくとも100個の標的要素を含む請求項20に記載の方法。
- 【請求項22】前記アレイが、標的要素を100-10,000個の標的要素/平方センチメートルの範囲の密度で含む請求項20に記載の方法。
- 【請求項23】それぞれの標的要素で(i)第一色および第三色間の(ii)第二色および第三色間の蛍光比を測定することを更に含む請求項20に記載の方法。
- 【請求項24】検出工程(c)からのデータをプログラム化された計算機で処理し、そのままのおよび処理されたデータをデータベース中に記憶し、そしてそのままのおよび処理されたデータを表示することを更に含む請求項20に記載の方法。
- 【請求項25】未標識の保護核酸の添加を更に含む請求項20に記載の方法。
- 【請求項26】ヒトの療法の選択における上記方法に由来するデータの使用を更に含む請求項20に記載の方法。
- 【請求項27】染色体DNA集団を、PCRを含む方法によって生産する請求項20に記載の方法。
- 【請求項28】前記組織試料が1種類の細胞を含む請求項20に記載の方法。
- 【請求項29】前記組織試料がヒト腫瘍試料を含む請求項20に記載の方法。
- 【請求項30】前記組織試料が血液細胞を含む請求項20に記載の方法。
- 【請求項31】前記組織試料がヒト割球細胞またはヒト極体を含む請求項20に記載の方法。
- 【請求項32】前記組織試料を顕微解剖によって生産する請求項20に記載の方法。
- 【請求項33】前記方法を中規模装置で行なう請求項20に記載の方法。
- 【請求項34】組織試料中の遺伝子発現および染色体異常の同時検出方法であって、(a)固体支持体に結合した核酸標的要素のアレイを提供し、ここにおいて、該核酸標的要素は、組織試料の遺伝子発現および染色体配列を示す核酸に予め選択されたハイブリダイゼーション条件下で実質的に相補的なポリヌクレオチド配列を含み;
- (b)少なくとも3種類の標識された核酸集団、(i)第一蛍光色で標識され且つ組織試料に由来するmRNAまたはcDNA集団、(ii)第二蛍光色で標識され且つ組織試料に由来する染色体DNA集団、および(iii)第三蛍光色で標識された少なくとも一つの対照核酸集団を提供し;

(c)該アレイと該標識された核酸集団とをハイブリダイゼーション条件下で接触させ;そして(d)少なくとも2種類の標的要素での第一、第二および第三蛍光色それぞれの存在および強度を検出することを含む上記方法。

【請求項35】前記標的核酸要素が、8bp—約100bpの範囲のオリゴマーを含む請求項34に記載の方法。

【請求項36】前記アレイが少なくとも100個の標的要素を含む請求項34に記載の方法。

【請求項37】前記アレイが、標的要素を100—10,000個の標的要素/平方センチメートルの範囲の密度で含む請求項34に記載の方法。

【請求項38】それぞれの標的要素で(i)第一色および第三色間の(ii)第二色および第三色間の蛍光比を測定することを更に含む請求項34に記載の方法。

【請求項39】検出工程(c)からのデータをプログラム化された計算機で処理し、そのままのおよび処理されたデータをデータベース中に記憶し、そしてそのままのおよび処理されたデータを表示することを更に含む請求項34に記載の方法。

【請求項40】未標識の保護核酸の添加を更に含む請求項34に記載の方法。

【請求項41】ヒトの療法の選択における上記方法に由来するデータの使用を更に含む請求項34に記載の方法。

【請求項42】染色体DNA集団を、PCRを含む方法によって生産する請求項34に記載の方法。

【請求項43】前記組織試料が1種類の細胞を含む請求項34に記載の方法。

【請求項44】前記組織試料がヒト腫瘍試料を含む請求項34に記載の方法。

【請求項45】前記組織試料が血液細胞を含む請求項34に記載の方法。

【請求項46】前記組織試料を顕微解剖によって生産する請求項34に記載の方法。

【請求項47】前記cDNAが、100bp—5,000bpの範囲の複雑度を有するcDNAを含む請求項34に記載の方法。

【請求項48】前記標的核酸要素が少なくとも一つのペプチド核酸を含む請求項34に記載の方法。

【請求項49】前記方法を中規模装置で行なう請求項34に記載の方法。

【請求項50】前記標的要素が、8bp—約100bpの範囲のポリヌクレオチドを含む請求項1に記載の方法。

【請求項51】前記組織試料が膀胱組織を含む請求項4に記載の方法。

【請求項52】前記組織試料が肺組織を含む請求項4に記載の方法。

【請求項53】前記組織試料が前立腺組織を含む請求項4に記載の方法。

【請求項54】前記組織試料が乳房組織を含む請求項4に記載の方法。

【請求項55】前記組織試料が食道組織を含む請求項4に記載の方法。

【請求項56】前記組織試料が頸部組織を含む請求項4に記載の方法。

【請求項57】前記組織試料が卵巣組織を含む請求項4に記載の方法。

【請求項58】前記組織試料が結腸組織を含む請求項4に記載の方法。

【請求項59】前記組織試料が脳組織を含む請求項4に記載の方法。

【請求項60】前記組織試料が胃組織を含む請求項4に記載の方法。

【請求項61】前記組織試料が皮膚組織を含む請求項4に記載の方法。

【請求項62】前記組織試料が脾臓組織を含む請求項4に記載の方法。

【請求項63】前記組織試料がヒト割球を含む請求項4に記載の方法。

【請求項64】前記組織試料がヒト極体を含む請求項4に記載の方法。

【請求項65】少なくとも2種類の対照核酸集団の使用を含む請求項1に記載の方法。

【請求項66】少なくとも4種類の対照核酸集団の使用を含む請求項1に記載の方法。

【請求項67】少なくとも2種類の対照核酸集団の使用を含む請求項20に記載の方法。

【請求項68】少なくとも2種類の対照核酸集団の使用を含む請求項34に記載の方法。

【請求項69】少なくとも2種類の対照核酸集団の使用を含む請求項4に記載の方法。

【請求項70】前記組織試料が癌細胞系を含む請求項4に記載の方法。

【請求項71】少なくとも4種類の別個の蛍光標識された核酸集団を前記アレイとハイブリッド形成させる請求項20に記載の方法。

【請求項72】少なくとも8種類の別個の蛍光標識された核酸集団を前記アレイとハイブリッド形成させる請求項20に記載の方法。

【請求項73】少なくとも4種類の別個の蛍光標識された核酸集団を前記アレイとハイブリッド形成させる請求項5に記載の方法。

【請求項74】少なくとも4種類の別個の蛍光標識された核酸集団を前記アレイとハイブリッド形成させる請求項34に記載の方法。

【請求項75】少なくとも8種類の別個の蛍光標識された核酸集団を前記アレイとハイブリッド形成させる請求項34に記載の方法。

【請求項76】少なくとも一つの染色体イデオグラムをアレイデータと一緒に表示することを更に含む請求項8に記載の方法。

【請求項77】少なくとも一つの染色体イデオグラムをアレイデータと一緒に表示することを更に含む請求項24に記載の方法。

【請求項78】少なくとも一つの染色体イデオグラムをアレイデータと一緒に表示することを更に含む請求項40に記載の方法。

## 詳細な説明

### 【発明の詳細な説明】

【0001】政府権利米国は、National Institute of Standards and TechnologyによるATPプロジェクト第94-05-0021号、授与番号70NANB5H1108の付与によって本発明の当然の権利を有する。

【0002】  
【発明の属する技術分野】本発明は、概して、ヒトまたは動物の組織試料中の核酸の評価に関する。より詳しくは、本発明は、組織試料中の遺伝子発現および染色体異常についての同時測定に関する。

【0003】  
【従来の技術】遺伝子の発現における特定の遺伝子の発現のタイミングおよびレベル双方の異常は、癌および他のヒト疾患の根本的な原因である。ゲノムDNA、すなわち、染色体における異常も、癌および他のヒト疾患の根本的な原因であり、しばしば、遺伝子の過発現または発現不足をもたらす。染色体間の平衡転座および逆位、および塩基対変化などの若干の染色体異常は、DNA配列コピー数の変化を伴わない。他のゲノムDNA異常は、染色体ごとの正常な1コピーからのDNA配列コピー数の変化を含む。これらゲノムDNA異常は、しばしば、コピー数増加に関して遺伝子増幅およびコピー数減少に関して遺伝子欠失と称される。例えば、乳癌の約25-30%で見られる一つの攻撃的な形の乳癌は、染色体17のq12バンドに位置するHer-2/neu癌遺伝子の遺伝子増幅および過発現に起因する。この遺伝的異常のある乳癌患者は、全生存および無疾患生存双方について、この異常のない患者よりもかなり予後がかなりよくない。更に、Her-2遺伝子の過発現は、その遺伝子の染色体遺伝子座の遺伝子増幅が不存在の場合、その疾患の初期のあまり攻撃的でない段階で起こる。Borgら、"Her-2/neu Activity in Human Breast Cancer," Cancer Research 50, 4332-4337 (1990年7月15日)。したがって、乳癌についての適切な評価および治療技術には、Her-2遺伝子発現の存在およびHer-2遺伝子染色体コピー数を測定する試験が必要である。

【0004】Her-2遺伝子コピー数のような染色体異常は、蛍光インサイチオハイブリッド形成法("FISH")を用いる検定によって評価することができる。FISH検定は、組織試料の形態学的に自然のままの中期塗抹または間期細胞中に存在する染色体DNAへのDNAプローブのハイブリダイゼーションを行なう。米国食品医薬品局は、最近、結節陽性乳癌患者におけるHer-2コピー数の検出およびアドリマイシン療法の結果の予想のためのVysis, Inc. (ダウナーズ・グローブ、イリノイ州)から入手可能なPathVysion™ Her-2診断用FISH試験を認可した。

【0005】癌は、乳癌によって代表されるような多発型の疾患をもたらす多数の遺伝子の異常も伴い、この場合、大部分の症例でHer-2癌遺伝子には異常がない。固体基体に結合した多数の核酸プローブの二次元アレイへのハイブリダイゼーションを用いる、いわゆる"DNAチップ(Chip)"または"マイクロアレイ"試験は、多数の遺伝子発現異常を同時に評価する。例えば、米国特許第5,445,934号、"Array of Oligonucleotides on Solid Substrate," Fodorら、同第5,800,945,934号、"Method of Detecting Nucleic Acids," Fodorら、および同第5,807,552号、"Methods for Fabricating Microarrays of Biological Substances," Brownらを参照されたい。それらマイクロアレイ遺伝子発現試験は、特定の疾患に的を絞った新規薬物の開発で益々用いられている。

【0006】タンパク質レベルでの多数の遺伝子発現は、基体上の固定された抗原の二次元アレイである"マイクロドット"免疫検定の使用によって調べることもできる。例えば、1982年2月3日優先

日の米国特許第5, 486, 452号, "Devices and Kits for Immunological Analysis," Gordonら、およびEkinsら, *Analytica Chimica Acta*, 227:73-96(1989)を参照されたい。Gordonらの固定された抗原には核酸が含まれ、それらは、 $10^5/10$ 平方センチメートル(または $1,000/cm^2$ )の密度で配列されるように開示されている。Gordonらは、更に、そのアレイが、1982年に一般的な(Gordonら、項目17を参照されたい)ピペッティング装置の寸法より低い"固有分離度"を有するので、より高い密度で抗原を含有しようと開示している。Gordonらは、それらアレイを、機械的転移装置、小形アプリケーター、リソグラフィー手順または高速電子プリントの使用によって製造することができることを開示している。

【0007】米国特許第5, 665, 549号, "Comparative Genomic Hybridization (CGH)," Pinkelらは、多数の遺伝的異常の同時評価方法を開示している。CGHは、一つの蛍光色で標識された対照核酸集団および第二蛍光色で標識された試料核酸集団の、ヒト中期染色体塗抹などの対照ゲノムの全部または一部分への比較用多色ハイブリダイゼーションを行なう。得られた蛍光強度の対照ゲノムの位置での比較は、試料集団における染色体配列または発現された遺伝子配列のコピー数の決定を可能にする。マイクロアレイに基づくCGH試験は、多数のゲノムDNAまたは遺伝子発現異常の評価についても開示されている。米国特許第5, 830, 645号, "Comparative Fluorescent Hybridization to Nucleic Acid Arrays," Pinkelら; 同時係属および同一譲渡人の米国特許出願第09/185, 625号, "Improvements of Biological Assays for Analyte Detection," Mullerら; およびPinkelら, "High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays," *Nature Genetics*, 20巻, 1988年10月, 207-211頁を参照されたい。Pinkelらは、*Nature Genetics*で、ゲノムDNA中の単コピー変化を検出するマイクロアレイ標的へのCGHの能力を開示している。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】今日までのところ、遺伝子発現および染色体異常についての評価には、追加の試料処理および試薬経費をもたらす組織試料での別々の試験が必要である。遺伝子発現および染色体異常について別々に試験することは、入手可能であるよりも多くの組織を必要とすることもありうる。先行技術では、マイクロアレイへの多色ハイブリダイゼーションを用いる遺伝子発現および染色体異常の同時測定が開示されていない。本発明の目的は、組織試料での遺伝子発現および染色体異常について同時試験を行なうことによって別々の試験を避けることである。もう一つの目的は、遺伝子発現および染色体異常を単一核酸マイクロアレイで同時に試験することである。本発明の他の目的は、以下に詳述されるであろう。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、組織試料中の遺伝子発現および染色体異常両方の同時検出のための、固体支持体に結合した核酸標的要素のアレイを用いる多色比較用ハイブリダイゼーション検定法を含む。本発明の方法は、第一の検出可能マーカーで標識された組織mRNAまたはcDNA試料、第二の検出可能マーカーで標識された組織ゲノムDNA試料、および第三の検出可能マーカーで標識された少なくとも一つの対照核酸のアレイへの比較用ハイブリダイゼーションを用いる。各標的要素でのそれぞれのマーカーの存在および強度を検出し、そして例えば、(1)第一および第三マーカーの、および(2)第二および第三マーカーのマーカー比率を、標的要素それぞれについて測定する。遺伝子発現および染色体異常は、このようにして、それらマーカー比の分析によって同時に検出される。好ましい実施態様において、それらマーカーは、それぞれ蛍光標識である。

【0010】本発明は、ヒト疾患の治療技術において療法選択に指針を与えるより完全な遺伝的評価データを与えることにより、ヒトおよび動物用薬物開発プログラムにおいて治療的候補作用を評価することにより、および細菌およびウイルスの病原体診断において広く用いられる。特定の癌は、増幅された遺伝子のmRNAの過発現と共役した遺伝子増幅を特徴とし、より攻撃的な疾患でありうるし、より攻撃的な療法を必要とする。過発現を駆動する機序は、治療的介入が適切でありうることを理解する場合の基礎でありうると思われる。したがって、本発明の方法による遺伝子発現および増幅両方の特性決定は、改良された癌療法をもたらすことができる。

【0011】好ましい実施態様において、本発明は、組織試料中の遺伝子発現および染色体異常の同時検出方法であって、(a)固体支持体に結合した核酸標的要素のマイクロアレイを提供し、ここにおいて、該核酸標的要素は、組織試料中に存在する遺伝子発現の指標であり且つ染色体配列の指標である核酸に予め選択されたハイブリダイゼーション条件下で実質的に相補的なポリヌクレオチド配列を含み;



(b) 少なくとも3種類の標識されたプローブ核酸集団、(i) 第一蛍光色で標識され且つ組織試料からのmRNAに由来するcDNA集団、(ii) 第二蛍光色で標識され且つ組織試料に由来する染色体DNA集団、および(iii) 第三蛍光色で標識された少なくとも一つの対照核酸集団を提供し；  
 (c) 該マイクロアレイと該標識された核酸集団とをハイブリダイゼーション条件下で接触させ；そして  
 (d) 少なくとも2種類の標的要素について第一、第二および第三蛍光標識色それぞれの存在および強度を検出することを含む上記方法を含む。

【0012】同じ標的要素でのメッセージ、ゲノムおよび対照の核酸のハイブリダイゼーションの測定および比較は、発現およびゲノム変化の同時評価を提供する。本発明は、多数の対照核酸、例えば、第三蛍光色で標識されたゲノム対照DNAおよび第四蛍光色で標識された対照cDNA集団の使用も含む。それら核酸標的要素は、ゲノムDNAか、オリゴマーDNAまたはcDNA標的要素の混合好ましい実施態様は、ゲノムDNA標的要素およびオリゴマーDNAまたはcDNA標的要素の混合物を含むアレイを含み、それらオリゴマーDNA/cDNA標的は発現を測定し、ゲノムDNA標的は染色体変化を測定する。1平方センチメートル未満のチップ表面中に1,000種類の異なった遺伝子およびゲノム遺伝子座を測定できる標的要素密度を有するマイクロアレイを用いることも好ましい。

発明の詳細な記述(1)定義本明細書中において次の略語を用いる。

【0013】bp—塩基対CGH—比較用ゲノムハイブリダイゼーションDAPI—4, 6—ジアミノ—2—フェニルインドールdCTP—デオキシシトシン三リン酸DNA—デオキシリボ核酸(同様に機能しうる類似体を含めた一本鎖または二本鎖の形の)

dUTP—デオキシウリジン三リン酸FISH—蛍光インサイチオハイブリダイゼーションkb—キロベースmm—ミリメートルmRNA—メッセンジャーRNAng—ナノグラムnl—ナノリットルRNA—同様に機能しうる類似体を含めた一本鎖または二本鎖の形のリボ核酸μg—マイクログラムμl—マイクロリットルμm—マイクロメートルμM—マイクロモル“核酸”または“核酸分子”という用語は、天然に存在するヌクレオチドと同様に機能しうる天然ヌクレオチドの既知の類似体を含めた一本鎖または二本鎖の形のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドポリマーを意味する。

【0014】“エクソン”という用語は、成熟mRNA産物中に示される分断遺伝子の任意のセグメントを意味する。若干のタンパク質コーディング遺伝子は、非コーディングであるエクソン、例えば、ヒトc-myc遺伝子のエクソン1を有している。おそらく、タンパク質コーディング遺伝子は全て、部分的にコードしている最初と最後のエクソンを有する。

【0015】“単コピー配列”または“ユニーク配列”という用語は、遺伝子のコーディングエクソン配列などの、典型的に、ハプロイドゲノム当たり1回だけ存在する核酸配列を意味する。

【0016】“複雑度”という用語は、本明細書中において、Brittenら、Methods of Enzymol., 29:363(1974)によって確立されたようなこの用語の標準的な意味にしたがって用いられる。核酸複雑度の更に別の説明については、CantorおよびSchimmel, Biophysical Chemistry: Part III, 1228-1230頁も参照されたい。

【0017】“標的要素”という用語は、組織試料から単離された核酸にハイブリダイゼーション可能な固定されたまたは結合した核酸を含有する基体表面の部分の意味する。

【0018】“実質的に結合する”という用語は、組織核酸と標的要素核酸との間の相補的ハイブリダイゼーションを意味し、組織ポリヌクレオチド配列の所望の検出を行なうためにハイブリダイゼーション基剤のストリンジェンシーを低下させることによって適合されうる少ないミスマッチを包含する。

【0019】“特異的ハイブリダイゼーション”または“と特異的にハイブリッド形成する”という用語は、組織核酸が標的要素核酸に実質的に結合するが、規定のストリンジェンシー条件下でアレイ中の他の核酸に実質的に結合しないハイブリダイゼーションを意味する。当業者は、それらハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーの緩和が、配列ミスマッチを許容させることを理解するであろう。許容されるミスマッチの程度は、ハイブリダイゼーション条件の適当な調整によって調節することができる。

【0020】当業者は、本明細書中で記載された特定の核酸の正確な配列を、他のものと“実質的に同一”であり、しかも相補的核酸に実質的に結合する能力を保持している組織核酸プローブまたは標的要素核酸を生じるようにある程度まで修飾することができるということも理解するであろう。このような修飾は、具体的には、本明細書中の個々の配列に関して述べられる。ポリヌクレオチド配列の“実質的な同一性”という用語は、ポリヌクレオチドが、標準的なパラメーターを用いる下記の方法を用いて対照配列と比較して少なくとも90%、より好ましくは、少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含むことを意味する。

【0021】二つの核酸配列は、それら二つの配列のヌクレオチド配列が、下記のように最大限に一

致するために並べられた場合に同様であるならば、“同一”であるといわれる。“に相補的”という用語は、本明細書中において、相補的配列が対照ポリヌクレオチド配列の全部または一部分に相補的であることを意味するのに用いられる。

【0022】二つ(またはそれ以上)のポリヌクレオチド間の配列比較は、典型的に、配列類似性を有する局所部分を確認し且つ比較する“比較窓”の中の二つの配列について配列を比較することによって行なわれる。本明細書中で用いられる“比較窓”は、二つの配列を最適に並列させた後に同数の隣接位置の対照配列と配列を比較することができる少なくとも約20個、通常は約50ー約200個、より通常は約100ー150個の隣接位置のセグメントを意味する。

【0023】比較のために配列を最適に並列させることは、SmithおよびWaterman, Adv. Appl. Math. 2:482(1981)の局所相同性アルゴリズムによって、NeedlemanおよびWunsch, J. Mol. Biol. 48:443(1970)の相同性並列アルゴリズムによって、PearsonおよびLipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 85:2444(1988)の類似性探求法によって、およびこれらアルゴリズムの計算機処理された手段によって行なうことができる。

【0024】“配列同一性百分率”は、二つの最適に並列された配列を比較窓について比較することによって決定されるが、この場合、その比較窓内のポリヌクレオチド配列の一部分は、二つの配列の最適並列のための対照配列(付加または欠失を含まない)と比較される付加または欠失(すなわち、ギャップ)を含んでいてよい。その百分率は、同一の核酸塩基が両方の配列中にある位置の数を測定して、対合する位置数を得、その対合位置数を比較窓内の全位置数で割り、その結果に100を掛けて配列同一性百分率を生じることによって計算される。

【0025】ヌクレオチド配列が実質的に同一であるというもう一つの指標は、二つの分子が同様の配列にストリンジェント条件下でハイブリッド形成するかどうかである。ストリンジェント条件は配列依存性であり、様々な環境中で異なるであろう。概して、ストリンジェント条件は、規定のイオン強度およびpHにおいて特定の配列の熱融点(T<sub>m</sub>)より約5°Cー約25°C低いように選択される。そのT<sub>m</sub>は、DNA二重らせんまたはRNA-DNAハイブリッドの鎖が半分解離するまたは変性する温度(規定のイオン強度およびpHにおいて)である。

【0026】本明細書中で用いられる“プローブ”は、1種類またはそれ以上の化学結合によって、通常は、水素結合形成によって相補的配列の核酸を含む標的要素に結合することができる組織核酸分子(RNAかまたはDNA)の集団または集合として定義される。それらプローブ集団は、下記のように直接的にまたは間接的に標識される。それらプローブ集団は、典型的に、高複雑度を有し、例えば、組織細胞または組織細胞集団から単離された全ゲノムDNAまたは全mRNAから製造される。

(2)概要本発明の方法は、マイクロアレイ試験形式によって与えられる多数の核酸の評価能力と、CGHの多色比較用ハイブリダイゼーション能とを組合せて、同一組織試料中の遺伝子発現およびゲノム異常の両方を同時に評価する。本発明の方法は、組織試料に由来する核酸集団の多数の核酸標的要素を含む核酸アレイへの、適当なハイブリダイゼーション条件下のハイブリダイゼーションを用いる。それら核酸標的要素は、発現された遺伝子配列に相補的なゲノムDNAか、オリゴマーかまたはcDNA核酸、またはそれら2種類の混合物を含む。それら核酸集団は、異なった検出可能マーカーで別々に標識され、(1)組織試料中の遺伝子発現を示すmRNAまたはその相補的cDNAの混合物、および(2)組織試料のゲノム状態を示すゲノムDNAの混合物を含む。それら標識された核酸集団を、1種類またはそれ以上の対照核酸集団と一緒にアレイに同時ハイブリッド形成させるが、対照集団もそれぞれ、異なった検出可能マーカーでそれ自体標識されている。好ましくは、アレイに加えられる核酸集団全部を、それぞれ異なった蛍光マーカーで標識する。1種類または複数の対照核酸は、1種類または複数の対照に相対する組織試料の遺伝子発現状態またはゲノム状態の評価を可能にするように選択される。適当なハイブリダイゼーション時間後、蛍光色の存在および強度をアレイのそれぞれの標的要素で検出する。特定の標的要素での色間蛍光比の比較により、その標的要素に相補的であるゲノムDNA配列およびcDNA配列のコピー数が測定される。

【0027】ゲノムDNA配列は、概して、RNAで発現された配列の全部または一部分をコードする1個またはそれ以上の“エクソン”配列、およびヒトゲノム中の多数の地点で繰返される反復配列も含有することが多い1個またはそれ以上の非コーディング配列“イントロン”を両方とも含有する。ゲノム標的要素は、したがって、特定のゲノム配列にマッピングされる発現された遺伝子配列のためのハイブリダイゼーション標的として役立ちうる。同様に、特定の発現された遺伝子配列に相補的な標的要素は、ゲノムDNAのエクソン配列にも相補的である。したがって、ゲノムDNA標的要素およびcDNA標的要素は、それぞれ、ゲノムDNAかまたは発現された遺伝子配列核酸へのハ

ハイブリダイゼーションのためのアレイ形式で用いることができる。本発明の方法で用いられるアレイ形式は、(1)特定のゲノムDNA配列または(2)特定の発現された遺伝子配列にそれぞれ相補的な別々の核酸標的要素のマイクロアレイを含む。(1)に相補的な若干の標的要素および(2)に相補的ないくつかを含む標的要素混合物も用いることができる。

【0028】本発明の方法の顕著な利点は、遺伝子発現および染色体異常両方の同時決定である。Her-2が関与する乳癌などの若干の攻撃的な悪性型の癌は、1種類またはそれ以上の癌遺伝子の過発現およびそれぞれの癌遺伝子の染色体遺伝子座の遺伝子増幅の両方を特徴とする。癌遺伝子だけの過発現について調べることは、疾患状態の完全な特性決定に不適切である。したがって、本発明の方法を用いる遺伝子発現および染色体異常両方についての同一組織試料の同時試験は、過発現および過発現の分子原因の両方を好都合に確認し、それによって適当な予後評価および療法選択を可能にする。

【0029】標的要素のゲノム、cDNAまたは混合物の選択は、求められる組織および分析によって異なることがありうる。例えば、cDNA標的要素は、若干のゲノムDNA中に存在する反復配列の作用が減少し、発現される遺伝子のより正確な検出が可能であるので好都合である。ゲノムDNA標的要素は、より高い複雑度がより大きいシグナルを生じうるので好都合である。ゲノムDNAおよびcDNA標的要素の混合物は、より詳細なゲノムおよび発現の分析を与えるのに用いることもできる。

(3)標的要素中の核酸標的要素の核酸配列は、RNA、DNA、ペプチド核酸またはそれらの混合物が含まれるが、それらに制限されるわけではない核酸または核酸類似体のいずれの種類も含むことができるし、ベクター配列も含むクローンとして存在しうるまたは実質的に純粋でありうる。ペプチド核酸を含むアレイは、米国特許第5,821,060号, "DNA Sequencing, Mapping and Diagnostic Procedures Using Hybridization Chips and Unlabeled DNA," H. Arlinghausらで開示されている。

【0030】標的要素の核酸は、典型的に、ある選択されたゲノム(例えば、ヒトまたは動物のゲノムライブラリーからのクローンまたはいくつか隣接したクローン)の一定の部分にそれらの起原を有し、または完全であってよいまたは完全でなくてよいある選択されたゲノム(例えば、完全または部分cDNA配列)の機能性遺伝子単位に相当する。それら標的核酸は、インターAlu、またはクローン化されたDNAに由来する縮重オリゴヌクレオチドプライマーPCR産物を含むこともできる。

【0031】標的要素の核酸は、例えば、特定の遺伝子を含有することができるし、または目的の細胞、例えば、腫瘍細胞中に増加したまたは減少したコピー数で存在すると考えられる染色体部分に由来しうる。例えば、別々の標的要素は、下の表2に挙げられる癌遺伝子座それぞれに相補的なDNAを含むことができる。その標的要素は、異常なレベルで転写されると考えられるmRNAまたはこのようなmRNAに由来するcDNA、例えば、下の表2の遺伝子座にマッピングされる発現された遺伝子を含有してもよい。

【0032】或いは、標的要素は、有意性または位置が知られていない核酸を含むことができる。このような要素のアレイは、完全なゲノム、1本の染色体または染色体の一部が含まれるが、これらに制限されるわけではないゲノムのいずれか望ましい部分を連続してかまたは不連続地点でサンプリングする位置を示しうると考えられる。標的要素の数およびそれぞれの核酸の複雑度は、分析の密度を決定すると考えられる。例えば、それぞれの標的が異なったゲノムクローンからのDNAを含有する300個の標的要素のアレイは、完全なヒトゲノムを10メガベース間隔でサンプリングしうる、すなわち、分析しうると考えられる。それぞれが100kbのゲノムDNAを含有する3,000個の標的要素のアレイは、ヒトゲノムのユニーク配列部分の1メガベース間隔でほぼ完全な有効範囲を与えうると考えられる。同様に、アノニマスcDNAクローンからのまたは発現配列タグ(Expressed Sequence Tags; "ESTs")に相補的な核酸を含む標的要素のアレイは、いくつかの目的の細胞中で異なって発現されるかもしれないそれら発現された遺伝子配列の識別を可能にし、それによって、これら遺伝子の研究または診断のための発現異常の確認に注意を集中させると考えられる。

【0033】当業者は、それぞれの標的要素が、異なった長さおよび配列を有する標的核酸の混合物を含むことができるということを理解するであろう。標的要素は、概して、クローン化されたまたは合成されたDNA片の2個以上のコピーを含むであろうが、それぞれのコピーは、異なった長さのフラグメントに破壊されうる。本発明の標的要素配列の長さおよび複雑度は、本発明には重要ではない。当業者は、これら因子を調整して、ある与えられたハイブリダイゼーション手順に最適なハイブリダイゼーションおよびシグナル生産を提供し且つ異なった遺伝子またはゲノム位置の中で必要な分解能を提供することができる。

【0034】それら標的要素は、広く利用可能な合成機を用いて容易に合成されうる8ー約100bp、好ましくは、20ー80bp、そしてより好ましくは、約40ー約60bpの範囲のようなオリゴマーを含むことができる。標的要素中のオリゴマーは、当該技術分野において知られているようないずれかの方法によってアレイ基体上でインサイチオで合成することもできる。オリゴマー配列情報は、GEN BANKなどの核酸配列データバンク、Incyte Pharmaceuticals, Inc. (パロ・アルト, カリフォルニア州)製のLIFESEQなどの市販のデータベース、またはSAGE(遺伝子発現の連続分析)の使用によって作成されるようなESTデータを含めたいずれかの好都合な源から得ることができる。オリゴマーまたは部分cDNA要素については、遺伝子のmRNAの一部分に相補的な、または遺伝子の識別可能な重要な配列(発現されたタンパク質、すなわち、受容体結合部位の機能性部分をコードする配列の意味で重要)に相補的な部分配列を合成することだけが必要である。

【0035】それら標的要素は、より小さいcDNAについては、合成されたかまたはクローン化された、好ましくは、約100bpー約5,000bpの範囲の複雑度を有する部分または完全長さcDNA配列を含むことができる。cDNA標的要素は、慣用法を用いて製造されるまたはGenome Systems, Inc. (セント・ルイス, ミズーリ州)、Research Genetics(ハンツビル, アラバマ州)およびClontech(サウス・サンフランシスコ, カリフォルニア州)によって維持されるライブラリーなどの市販の源から得られる、所望の組織からの発現された遺伝子配列cDNAライブラリーから容易に得ることができる。

【0036】それらの標的要素は、任意の複雑度であるが、概して、約20,000bpー約250,000bp、好ましくは、約50,000bpー約175,000bpの複雑度を有するゲノムDNA配列を含むことができる。ゲノムDNAは、標準的なクローニング手順によって生産される任意のマッピングされたゲノムクローンから得ることができるし、またはAmerican Type Culture Collection(ロックビル, メリーランド州、以下ATCC)によって維持される染色体特異的ライブラリーなどの市販の源から得ることができる。好ましいゲノムライブラリー源は、Genome Systemsによって維持されるヒトDNA BACライブラリーである。

【0037】標的要素中で用いるのに選択されるゲノムDNAまたはcDNAの識別は、既知のまたは増幅された若しくは欠失したと確認される染色体配列の、または過発現されたまたは発現不足の遺伝子の位置によって決定することができる。ゲノムまたはcDNAクローンの識別は、例えば、<http://gdbwww.gdb.org/gdbtop.html>のU. S. National Institute of Health or the Genome Data Baseによって維持されるGene Map' 98の遺伝子データを用いてプライマー配列対を設計することによって行なわれる。例えば、Her-2遺伝子は、約40kbのゲノム配列を含むと考えられ、PCRプライマー対は、公表されたher-2配列に基づいて設計することができる。次に、そのPCRプライマー対またはPCRアンプリコン産物を用いてゲノムDNAライブラリーをスクリーニングして、相補的配列を含有するクローンを識別することができる。そのスクリーニングで識別されるゲノムDNAクローンを、本発明の方法においてアレイ上で用いて、Her-2遺伝子座のゲノム異常を識別することができる。

【0038】ヒトの遺伝的異常の検出と同時に、ウイルスおよびウイルス遺伝子発現を検出するアレイの使用について、標的要素は、既知のまたは識別されたウイルス配列に相補的な配列を含むことができる。それらアレイ標的要素は、ヒトまたは動物のゲノム中のウイルス組込み部位を検出するように設計することもできる。このような病原体アレイの使用は、例えば、ヒト子宮頸癌とヒトパピローマウイルス、およびヒト胃腸癌とh. ピロリ(pylori)の既知の関係ゆえに、医学的に有意である。同様に、既知の細菌遺伝子配列を用いて、標的要素の核酸を設計することができる。病原体配列に基づくアレイの使用は、食品および環境の試験でも用いることができる。

(4)標的要素標的要素は、種々の寸法、形状および面積を有することができる。それら標的要素は、プリント法、例えば、機械的転写、グラビア、インクジェットまたは捺印法によって生じる物理的に隔てられたスポットを含むことができる。それら標的要素は、米国特許第5,445,934号の写真平板インサイチオアレイ合成によって製造されるもののよう、近くに隣接していることもできる。それら標的要素は、好ましくは、平面上の概して丸い形状である。概して、より小さい要素が好ましく、典型的な標的要素は、直径が500ミクロン未満である。特に好ましい標的要素寸法は、高密度を得るように直径が約5ミクロンー250ミクロンである。

【0039】標的要素密度は、任意の望ましい密度でありうるが、好ましくは、核酸マイクロアレイに特有の、すなわち、標的要素約100個/平方センチメートルより大きい密度である。ヒト疾患治療技術における好ましい使用には、標的要素密度は、好ましくは、チップ表面の1平方センチメートル当り約100ー約10,000個の標的要素の範囲である。より高いまたはより低い密度が望ましいことがあり、より高い密度は、より多数の発現された遺伝子配列の検査を可能にする薬物開発で用いる

のに好ましいことがありうる。

(5)アレイ製造マイクロアレイは、任意の望ましい方式で製造することができ、アレイ製造のためのロボット付着および合成インサイチオ法の両方が知られている。例えば、米国特許第5,486,452号、同第5,830,645号、同第5,807,552号、同第5,992号および同第5,445,93号、同第5,830,645号、同第5,807,552号、同第5,992号および同第5,445,93号を参照されたい。ロボット付着方法および装置を用いてマイクロアレイを製造することは好ましく、4号を参照されたい。ロボット付着方法および装置を用いてマイクロアレイを製造することは好ましく、これは、1988年5月27日出願の同時係属の同一譲渡人の米国特許出願第09/085,625号、"Improvements of Biological Assays for Analyte Detection," Mullerら(以下、"Mullerら")で開示されたように、細管針またはピンによる核酸のロボット付着を用いて、クロムで被覆された基体上の列および段に固定される物理的に隔てられたすなわち"スポットの"標的要素の二次元マイクロアレイを生じる。

【0040】多数の細管針を含むロボットアプリーケーターを用いることができる。異なった核酸の適用の間に洗浄されるピンを用いる、またはロボットピン交換器を用いる単針アプリーケーターを用いることもできる。用いられる針は、好ましくは、33ゲージ、1インチ長さステンレス鋼製細管注射針である。その針を核酸貯槽、好ましくは、Luerロックシリンジ先端に連結させる。好ましい針および貯槽は、EFD(イースト・プロビデンス、ロード・アイランド州)から商業的に入手可能である。それぞれ異なった核酸を付着している多数の細管針を用いることが好ましく、それによって、付着の間の洗浄工程が省かれる。

【0041】任意の適当な量の核酸をそれぞれの標的要素中に付着させるが、その標的要素寸法は、付着される量に依る。それぞれの標的要素について、その量は、 $1\text{ ng}/1\text{ nl}$ の核酸濃度の核酸溶液を約0.05nlー約5.0nlでありうる。標的要素 $1,000\text{ 個}/\text{cm}^2$ の密度について、標的要素当たりの付着される個々の量は、 $1\text{ ng}/1\text{ nl}$ 溶液を約0.2nlー約2.0nlである。核酸は、変性核酸の付着を可能にするであろう任意の溶媒中で与えられる。好ましくは、核酸は、100mM NaOH中において $1\text{ ng}/1\text{ nl}$ 濃度で与えられる。

【0042】ロボット製造を助けるために、自動追跡および標識の方法および装置を、例えば、特定の標的要素での付着に正しい核酸を供給する場合に用いることができる。例えば、異なった核酸を含む細管ピンのバーコード化またはトランスポンダ標識または追跡は、所望の標的要素へ正しい核酸を確実に供給するのに有用である。バーコード化またはトランスポンダ標識の使用も、製造工程のより良い計算機制御を可能にする。

【0043】cDNAおよびゲノムDNA両方の標的要素を含むマイクロアレイは、いずれの配置でも生じることができる。例えば、cDNA要素は、アレイの1か所に位置することができるし、またはゲノムDNA標的要素の中に散在することができる。平坦な基体表面上の二次元アレイの規則性は、容易な蛍光検出および分析を可能にするのに好ましいが、そのアレイは、いずれか望ましい配置で製造することができる。

【0044】個々の標的要素は、1回だけ生じることができるまたは結果の分析に統計学的分析能を与えるように反復試験することができる。標的要素 $3,000\text{ 個}/\text{cm}^2$ の密度のアレイについて、それぞれの標的をそのアレイ上で3回反復試験するようにアレイを製造して、それら結果についてより良い較正を提供することが好ましい。出願人らは、 $1\text{ cm}^2$ 未満の基体表面積のマイクロアレイを用いる場合、それら反復試験片を、それら結果に重大な作用をもたらすことなく、互いに隣接してまたは分離して置くことができることを確認している。

【0045】好ましくは、個々のマイクロアレイを、大型の基体プレートまたはウェファー上で製造し、これに、半導体産業で周知の手順を用いて個々のチップに分けるために刻みをつける。クロム被覆ガラスプレートまたはウェファーは、Nanofilm(ウェストレーク・ビレッジ、カリフォルニア州)から商業的に入手可能であり、慣用法を用いて刻みをつけることができる。したがって、多数のチップは、一つのロボットアプリーケーターを用いて同一ウェファー上で一度に製造した後、個々のチップに分けることができる。プリントする前に、それらウェファーを、好ましくは、蒸留水、イソプロパノール、メタノールおよび蒸留水の洗浄を順に用いて洗浄する。窒素を用いて過剰の水を送風除去し、洗浄されたウェファーを乾燥させる。

【0046】好ましいMullerら装置は、それぞれの核酸を付着させるために低空気圧の噴出を適用する細管ピンアプリーケーターのためのX-YおよびZ軸制御器を用いる。Mullerらの装置で適当なZ軸制御器を用いて、細管ピンを基体表面と接触させないことは更に好ましい。その表面上、例えば、約 $100\text{ }\mu\text{m}$ 上にピンの位置を定めることは、より良いスポットサイズ規則性およびより低い空気圧の使用を可能にする。

【0047】プリントを開始する場合、そのプレートまたはウェファーを室温まで平衡させる。次に、各

チップのZ軸高さを、ロボット制御器によって用いるために決定する。好ましくは、プリントは、並列調整のための各チップの一方の隅の300 $\mu$ m直径“マーカー”スポットの付着で始める。窒素圧は低く、好ましくは、約1psiまたはそれ未満であり、付着されるその粘度および量が与えられる特定の核酸を付着する十分な圧力である。窒素パルス長さは、概して、約10ミリ秒である。

【0048】種々の対照標的要素、例えば、(1)全ゲノムDNA、(2)ベクターDNA、(3)各標的要素からのゲノムDNAまたはcDNAのプールされた混合物、(4)正常組織からの全RNA、または(5)既知の異常がある組織からの全ゲノムまたはcDNAを含む標的要素などを含むことも好ましい。それら対照標的要素は、それぞれが特定の発現された遺伝子またはゲノム配列の既知のコピー数の核酸を含む一連の標的要素を含むこともできる。例えば、ヒトX染色体の1、2、3、4および5コピーを含む細胞系から抽出されたゲノムDNAを用いることができる。

【0049】好ましいロボット付着製造の品質管理には、製造されたアレイを、立体顕微鏡およびCCDカメラを用いて画像化することが好ましい。各チップの画像を捕捉し且つ分析する。失われた、寸法を誤ったまたは形の歪んだ標的要素を有するチップを識別し、印をつける。

【0050】クローン化cDNAまたはクローン化ゲノムDNAを用いる場合、ベクター配列は、いずれか適当な処理で付着する前に除去することができ、またはそれらがハイブリダイゼーションを有意に妨げないならば保持することができる。クローン化ゲノムDNAおよびcDNAには、ベクター配列を除去しないことが好ましい。

【0051】米国特許第5,445,934号および同第5,807,552号で開示されたものを含めたいずれか適当な基体を用いることができる。その基体は、例えば、ガラス;ポリスチレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリスルホンおよびポリエステルなどのプラスチック;クロムおよび銅などの金属;金属被覆基体;および任意の材料のフィルターでありうるが、これらに制限されるわけではない。固定された核酸を有する基体表面は、好ましくは平坦であるが、アレイ標的要素を隔てる、例えば畝および溝を有する基体を含めたいずれか望ましい表面を用いることができる。それら核酸は、別個に識別可能であるビーズに結合させることもできる。Mullerらの平坦なクロム被覆ガラス基体が好ましい。

【0052】標的要素の核酸は、それらをハイブリダイゼーションに利用可能にさせる共有結合または非共有結合を含めたいずれか適当な方式で基体に結合させることができる。Mullerらの非共有結合法が好ましい。

(6)組織核酸核酸集団は、ヒト、植物および動物の組織を含めた任意の組織源に由来しうる。その組織試料は、新規に得られた試料、凍結試料、生検試料、血液試料、羊水穿刺試料、パラフィンの組織試料などの保存組織(すなわち、組織塊)、または細胞培養物を含めた任意の組織を含む。したがって、その組織試料は、全血試料、皮膚試料、上皮細胞、軟組織細胞、胎児細胞、羊膜細胞、リンパ球、顆粒球、疑わしい腫瘍細胞、器官組織、割球および極体を含むことができる。検査される組織は、顕微解剖から得られて、より均一な細胞集団を生じることができる。パラフィン固定組織は、ろうを除去するいずれか適当な処理で予め処理されるが、パラフィン前処理キットは、Vysis, Inc. から商業的に入手可能である。体外受精操作中に検査されるヒト割球細胞などの単細胞を含めた任意の適当な量の組織を用いることができる。母親の血液試料から分離されるヒト胎児細胞を調べる場合のように、1個だけまたは数個の細胞が入手できる場合、核酸の量を増幅させる核酸増幅技術を用いることができる。

【0053】組織に由来する核酸集団は、いずれか適当な核酸分離法または精製法によって製造する。ゲノムDNAおよびメッセンジャーRNA両方の核酸分離法は、Qiagen製のDNA単離用QIAamp組織キットなどが商業的に入手可能である。例えば、mRNAは、組織から抽出した後、逆転写酵素での処理によってcDNAに変換することができる。不十分なcDNAしか入手できない場合、そのcDNAをポリメラーゼ連鎖反応によって増幅させることができる。この周知の方法は、RT/PCRと称される。cDNAを相補的RNA(“cRNA”)に変換することも可能である。

【0054】概して、組織から約100万個を超える細胞が入手できる場合、組織核酸を抽出し、そして増幅させることなく用いることができる。約100万個未満の細胞しか入手できない場合、好ましくは、核酸増幅または濃縮を用いる。好ましくは、このような増幅技術はPCRである。PCRでは、混入する何等かの人為物を避けるまたは識別するように注意し且つ適当に管理すべきである。

(7)対照核酸対照核酸集団は、対照として役立つように選択される任意の適当な核酸混合物である。例えば、対照集団は、正常組織からの全ヒトゲノムDNA、検査され且つcDNAに変換される組織の正常試料から抽出される全mRNA、または特定の発現される遺伝子の合成または天然に存在するcDNA混合物でありうる。対照は、制御分析を可能にする“内標準化された(spiked)”既知量の特定のゲノムまたはcDNA配列を含むこともできる。



(8) 標識付け用いられる標識は、いずれの検出法によっても検出可能な任意の適当な非放射性マーカーでありうる。例えば、それら標識は蛍光分子でありうるし、またはタンパク質、ハプテンまたは酵素でありうる。更に、スズのいろいろな同位体のような“質量スペクトル”標識は、MALDI (マトリックス助レーザーデソープシオンイオン化) などのレーザー分離および質量分析法によって、アレイへのハイブリダイゼーション後に容易に検出することができる。Wuら, *Analytical Chemistry* 66, 1637 (1994) および Wuら, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 7, 142 (1993) を参照されたい。好ましくは、それら標識はそれぞれ、フルオレセイン、テキサスレッドおよび5- (および6-) カルボキシテトラメチルローダミンのような、広範な“クロストーク (cross-talk)” 補正を必要とすることなく互いに容易に区別されるように十分にスペクトルが分離している蛍光マーカーである。核酸への結合に有用な蛍光標識化合物の広範なリストは、米国特許第5, 491, 224号, “Direct Label Transaminated DNA Probe Compositions for Chromosome Identification and Methods for their Manufacture,” Bittnerらで明らかである。使用に適した蛍光化合物は、MolecularProbe (ユージーン, オレゴン州) から商業的に入手可能である。フルオレセインで標識されたアビジンなどの蛍光タンパク質との接触によってアレイへのハイブリダイゼーション後に蛍光標識される、ビオチンおよびフィコエリトリンのような間接標識も用いることができる。

【0055】1種類または複数の対照集団、および組織核酸集団は、末端標識、ニックトランスレーションまたは化学形質転換などによるいずれか適当な方法で標識される。好ましくは、RTかまたはPCR処理中に、標識組込み工程を用いて、得られたcDNAを望ましい蛍光色で標識する。分離された染色体DNAは、末端標識、ニックトランスレーションおよび化学標識を含めたいずれか適当な標識化学を用いて標識することができる。ニックトランスレーションを用いて、蛍光dUTPまたはdCTPを用いる適当な蛍光色で染色体DNAを標識することは好ましい。適当な蛍光標識されたdCTPの製造は、以下、“Cruickshank” と称されるK. Cruickshank, *Anal. Biochemistry*, “Quantitation of Fluorescent Nucleotide Incorporation by Capillary Gel Electrophoresis and Laser Induced Fluorescent Detection,” (印刷中) で開示されている。適当なニックトランスレーションキットは、商業的に入手可能である。

【0056】好ましくは、対照集団としての全ヒトゲノムDNAの使用には、米国特許第5, 506, 350号, “Production of Chromosome Region Specific DNA Sequences and Transamination,” Bittnerらで開示されている重亜硫酸塩触媒アミノ交換法によって標識付けを行なう。このような方法で標識された全ヒトゲノムDNAは、Vysis, Inc. (ダウナーズ・グローブ, イリノイ州) から商業的に入手可能である。

【0057】用いられる標識法は、核酸への発蛍光団の直接結合を用いる場合、好ましくは、約0.3-約6.0モル%標識ヌクレオチドの核酸集団それぞれの標識含量をもたらし、用いられる標識組織核酸および対照核酸それぞれの量は、好ましくは、約100ng-約1 $\mu$ g、好ましくは、約300ng-約425ngの範囲である。

(9) アレイハイブリダイゼーション組織および対照核酸集団を、適当なハイブリダイゼーション条件下、すなわち、ストリンジェンシーで、単コピーゲノム配列のハイブリダイゼーションの検出を可能にするように選択される一定時間、アレイにハイブリッド形成させる。そのハイブリダイゼーション条件には、緩衝液、ホルムアミドなどの変性剤、塩添加剤および促進剤の選択が含まれる。LSI Hybridization Buffer (Vysis, Inc.) などの、ホルムアミドおよび硫酸デキストランを含有する規定のpHおよび塩類条件のハイブリダイゼーション緩衝液は、商業的に入手可能である。緩衝液は、好ましくは、約6.8-約7.2のpH、約1.5 $\times$ SSC-約2.5 $\times$ SSCの塩分、および約40-50%のホルムアミド含量を有する。適当な条件には、約40-約80摂氏度の温度、およびゲノムおよび発現両方のバックグラウンドを越えるシグナルを検出するのに十分な時間、約1-約72時間、好ましくは、12-24時間が含まれる。硫酸デキストランなどのハイブリダイゼーション促進剤は、所望ならば用いることができる。組織および核酸集団を全ての標的要素と接触させる適当な拡散が必要である。これは、単純な拡散によって、或いは揺動などによる機械的混合、またはアレイが入っているハイブリダイゼーション室を出入りする標識集団の微量流体ポンプ輸送などによる流体拡散を含めたいずれか適当な手段を用いて拡散を促進するまたは拡散限界を克服することによって達成できる。ハイブリダイゼーション後洗浄は、好ましくは、ハイブリダイゼーションの場合より大きいストリンジェンシーにおいて行われる。

【0058】ヒトゲノムDNA標的要素を含むアレイを用いる場合、Life Technologies, Inc. から入手可能なCot1 DNAなどの過剰の未標識ヒト反復配列DNAをハイブリダイゼーション混合物に加えて、組織核酸集団中または用いられるならば対照ゲノムDNA中に存在する標識反復配列のハ

イブリダイゼーションから得られる非特異的シグナルを抑制することも好ましい。未標識反復配列DNAの使用は、概して、全標識ゲノムDNA(組織および対照両方)1ng当り約0.02ー約5.0ig、好ましくは、全標識ゲノムDNA1ng当り約0.1ー約0.5igの量である。

【0059】ハイブリダイゼーションは、アレイと接触しているそれら集団を適当な時間維持するであろういずれか適当な装置中に行なうことができる。例えば、標識集団をアレイに加え、カバースリップで覆った後、オープン中において予め選択された温度でインキュベートすることができる。好ましくは、その底面とアレイ基体上部との間に望ましいハイブリダイゼーション容積を与えるように設計されたカバースリップを用いる。標識集団は、1996年2月7日公開の欧州特許出願第0695941A1号、“Method and Apparatus for Packaging a Chip,”で開示されたような密封カートリッジ装置中に含有されたアレイに微量流体注入および循環によって加えることができる。ハイブリダイゼーションは、1997年1月23日公開のPCT特許出願第WO97/02357号、“Integrated Nucleic Acid Diagnostic Device,”で開示されたような小形ハイブリダイゼーションおよび検定チップで行なうこともできる。このような小形チップは、中規模で製造される、すなわち、 $10^{-8}$ および $10^{-9}$ リットルの量で測定される流路および反応室の容積を有して製造されるといわれる。

【0060】図1ー5は、好ましいハイブリダイゼーションカートリッジの成分を示す。図1は、第一成分であって、マイクロアレイ32の固定された核酸標的要素31を含有するクロム被覆ガラス“チップ”30を示す。マイクロアレイ32は、好ましくは、示されているようにチップ30の中心に位置する。好ましい形式において、チップは、25.4mm長さ×16.93mm幅×0.7mm厚みであり、マイクロアレイは10.5mm長さ×6mm幅の面にわたる。図2で示される第二成分は、“アレイ窓”34の四角および円形の2種類の別の形状で示される“プローブクリップ”33である。プローブクリップ33は、いずれか適当な材料、好ましくはプラスチックから製造することができる。アレイ窓34は透明な材料から成り、マイクロアレイを容易に画像化させるような位置および大きさである。プローブクリップ33は、ハイブリダイゼーション室を形成し、保持装置および保護カバーとしてアレイの上にぴったり適合している。好ましくは、アレイ窓34は、直径1.27mmで、25.4mm長さ×16.76mm幅のプローブクリップ33の中心に位置する。

【0061】図3および4は、第四成分であるチップホルダー36の平面図および側面図であり、これは好ましくは、物理的安定性を損なうことなく必要なハイブリダイゼーション温度に耐えることができる耐衝撃性ポリスチレンなどの頑丈な射出成形可能プラスチックから製造される。チップホルダー36は、チップを保持するのに望ましい任意の寸法でありうるが、好ましくは、25.4mm幅×76.2mm長さ×3.2mm厚みである。示されているように、一方の先端近くに、チップホルダー36は、マイクロアレイ32を有するチップ30を許容する大きさの、好ましくは、26mm長さ×18.5mm幅×1.7mm深さのキャビティ37を含有する。キャビティ37は、その長さに沿って両側に僅かに、好ましくは、0.5mm広くなって、アクセスギャップ38を作り、プローブクリップおよび顕微鏡カバースリップの一層容易な着脱を可能にする。キャビティ底面には、浅い溝の刻みをつけて、チップを適所に保持するように考案された接着剤または固定剤の塗抹を容易にする。キャビティ37の反対側の端のチップホルダー36は、その上面のホルダーの幅に沿って微かに刻みをつけて、使用者がより把握しやすい表面を与えることができる。チップホルダー底部は、アレイ読取り機での並列を容易にするように溝を刻むことができる。

【0062】完成したカートリッジの製造においては、望ましい標的要素を含むマイクロアレイを上記のように製造した後、いずれか適当な接着剤でキャビティ37の底部に接着する。次に、そのアレイを有するチップホルダー36を収縮包装し、プローブクリップ33、アレイ画像化で用いられるカバースリップ、および核酸を標識する若しくは抽出するおよび／またはハイブリダイゼーションを実施するための任意の他の望ましい試薬と一緒にキット中に密閉する。本発明の方法を行なうために、使用者は、適当な緩衝剤および標識核酸集団(対照および組織)を含むハイブリダイゼーション溶液をマイクロアレイ表面に適用し、プローブクリップ33をそのマイクロアレイの上に置く。完成したカートリッジを図5で示す。図5で更に重なって示されているのは、Cheの好ましい画像化システムのカメラ視野35である。次に、そのカートリッジを、オープン中において望ましい湿度調整を用いて望ましいハイブリダイゼーション温度で所望の時間インキュベートする。

【0063】ハイブリダイゼーションが完了したら、プローブクリップ33を除去し、そのチップを望ましいストリンジェンシーで、好ましくは、順に、2×SSCを用いて室温で5分間、2×SSCおよび50%ホルムアミドを用いて40℃で30分間、および2×SSCを用いて室温で10分間洗浄して、ハイブリッド形成したプローブを除去する。Gel/Mount(Biomega, フォスターシティ, カリフォルニア州)およびDAPIをアレイに適用し、18mm×18mmガラス顕微鏡カバースリップを、まだホルダ



ー36中にあるアレイ上に密封する。次に、カバーされたチップを画像化して、ハイブリダイゼーション結果を検出する。

(10)アレイ検出ハイブリダイゼーション後、それぞれの標識色について蛍光の存在および強度を、いずれか適当な検出器または読取り装置および方法によって検出し且つ測定する。レーザーによるアレイ走査検出器は、当該技術分野で知られている。米国特許第5,578,832号, "Method and Apparatus for Imaging a Sample on Device," Trulsenらを参照されたい。アレイハイブリダイゼーションの光導波管検出法も開示されている。米国特許第5,843,651号, "Light Scattering Optical Waveguide Method for Detecting Specific Binding Events," D. Stimpsonらを参照されたい。好ましくは、1998年3月27日出願の同時係属、同一譲渡人の米国特許出願第09/049,798号, "Large-Field Fluorescent Imaging Device," D. Che (以下、"Che"と称する)で開示されたような大視野画像化装置および方法を用いる。

【0064】Cheの大視野蛍光画像化装置は、高電力白色光源によって生じる励起ビームをマイクロアレイ表面上につなぐ反射光学素子を用いて高い照度を与え、その高い照度をアレイ検出器の高検出効率と組合せて高画像捕捉率を与える。光源によって生じる白色光を平行にし、計算機制御フィルターを通して励起ビームを与える。その励起ビームは、視野絞りを通過して明瞭なビームパターンを形成した後、凹面鏡を用いてアレイ表面上に投射される。その凹面鏡は、試料上の視野絞りを画像化するように配置されて、画像化光学素子の視野に対合する照明範囲を画成する。試料中で生じる蛍光は、励起色の散乱光を排除するように色フィルターを通され、そして画像化光学素子によってアレイ検出器上に画像化されて試料の蛍光画像が得られる。

【0065】アレイ画像化装置および方法は、画像化装置からのデジタル画像データのデータ分析、記憶および表示のために、プログラム化された計算機で用いられるデジタル画像処理アルゴリズムを用いることができる。いずれの適当なデジタル画像処理、データ記憶および表示ソフトウェアも、アレイハイブリダイゼーション結果の分析に用いることができる。デジタル画像化法は、例えば、米国特許第5,665,549号, "Comparative Genomic Hybridization," Kallioniemiらおよび米国特許第5,830,645号で開示されたように、当業者に知られている。

【0066】ハイブリダイゼーション画像は、好ましくは、Photometrics(スコッツデール、アリゾナ州)製のPSIインタフェースSenSys1600Cameraなどの、検出光学素子から直接的に大視野画像を受像する高解像度デジタル画像化カメラの使用によって捕捉され且つ分析される。他のいずれか適当なカメラも用いることができる。カメラによって捕捉された生画像データをいずれか適当な計算機データベースまたはデータ記憶ファイル中に記憶する。その生画像データを、適当な画像分析アルゴリズムを用いて処理し、マイクロアレイのそれぞれの標的要素でのマーカー強度を測定する。画像分析アルゴリズムは当業者に周知であり、多数のこのようなアルゴリズムのパッケージは、IPLabとしてScanalytics(フェアファックス、バージニア州)から入手可能である。

【0067】好ましくは、画像分析アルゴリズムは、適当な計算機ソフトウェアで実行される次の操作を行なう。(i)必要に応じたバックグラウンド補正;(ii)個々のアレイ要素の識別のためのアレイ標的要素すなわち"スポット"のセグメンテーション;(iii)各スポットへの段数および列数のスポットグリッド割当て;(iv)有効性および人工物の存在の検証、反復試験スポットのデータの平均化、全スポットからのデータの規格化、および多重実験比較および分析を含めたスポットデータ分析;(v)それぞれの蛍光マーカー色の全強度、平均DAPI対比染色強度、蛍光強度の画素当りの比率の平均、モード、メディアンおよび相関係数、および"質量比"と称される、全組織核酸マーカー強度対対照強度の比率を含めた単スポット計算値;(vi)スポットの有効反復試験数、スポット当りの質量比の平均および変動係数、および全スポットにわたる画素当り比率の相関係数を含めた標的要素の要約分析。好ましくは、用いられる画像分析は、窓に基づくモード推定値を用いてモード値が1.00であるように平均質量比を規格化する。

【0068】各標的要素での蛍光データを自動的に比較して、任意の望ましい組織および対照間のまたは組織間の比率を生じることができる。例えば、4種類の組織核酸(一次腫瘍ゲノムDNAおよびcDNA、および転移ゲノムDNAおよびcDNA)を2種類の対照(その腫瘍と同種の細胞の正常組織からの全ゲノムおよび全cDNA)と一緒に用いる場合、少なくとも8種類の異なった比率を計算することがありうる(それぞれの組織でそれぞれの対照の比率)。

【0069】画像分析は、好ましくは、(vii)飽和組織または対照色チャネルを有する画素を含むスポットの排除;(viii)排除のためのスポット寸法および形状判定基準;および(ix)域値未満の相対係数を用いるスポットの"相関係数"排除を含めた、個々の使用者による有効分析についての判定基準設定の方法も含む。アレイデータ分析は、個々の試験からのデータを、疾患の遺伝子型および表現型を含有するデータベース(すなわち、特定の疾患についての遺伝子発現および染色体異

常のリスト)と比較する比較アルゴリズムも含むことができ、個々の試験結果に基づいて可能な診断または療法の選択を決定することができる。

【0070】好ましくは、画像分析は、例えば、計算機モニタ表示および計算機印刷について当業者に知られているような計算機表示および印刷アルゴリズムを用いる。データ表示は、組織および対照核酸の個々の蛍光色について使用者によって選択される“プソイドカラー”画像を含むことができる。アレイデータ表示は、慣用的な染色体イデオグラムを表示を用いて、本発明の方法によって確認される一層明確な詳細染色体異常および発現遺伝子異常に結びつけることができる。典型的なイデオグラムについては、米国特許第5,665,549号の図9を参照されたい。好ましくは、アレイデータは、更に、分析から排除されるスポットに、使用者が容易に識別するための印をつけるように表示される。これは、“誤差色”中のまたは周りに着色環を有するその標的要素を表示することによって行なうことができる。

【0071】好ましい実施態様において、アレイ読取り機およびソフトウェアは、(1)DAPI対比染色(青)、(2)組織DNA(緑)、(3)組織cDNA(赤)および(4)対照DNA(橙)に特異的なそれぞれのチップの4種類の画像を自動的に捕捉する。これら画像を着色面と称する。しかしながら、より多くのまたは異なった着色面の画像を得ることができる。ソフトウェアの画像分析部分は、好ましくは、標的要素およびそれらのグリッド中の位置を識別する色(好ましくは、DAPI画像)の一つを用いる。全てのスポットがいったん識別されたら、そのソフトウェアは、それぞれのスポット下のそれぞれの画素を残りの着色面それぞれの強度について分析する。適当なアルゴリズムを用いて、これら着色面それぞれの局所バックグラウンドを測定した後、これをそれぞれの色の全強度から差し引く。次に、バックグラウンドで補正された強度を、特定の標的スポットまたはスポット群下の全ての画素について平均することができ、この画素当りの平均強度(例えば、DAPI強度についてA、組織DNA強度についてB、組織cDNA強度についてCおよび対照強度についてD)を様々な分析に用いることができる。

【0072】例えば、強度Aは、DAPI染色の強度が、標的スポットにおいて結合したDNAの全量の関数であるので、標的スポット品質の指示薬として用いることができる。Aについてある値未満(制御染色条件下)での標的要素DNAの量は、速度限界になりうる。対照DNAの強度Dは、この試薬が、好ましくは、所定の濃度で与えられ且つ品質管理されているので、ハイブリダイゼーション効率の指示薬として用いることができる。

【0073】好ましい分析において、最も重要な情報は、バックグラウンドで補正された対照強度に対するバックグラウンドで補正された組織強度の比率、すなわち、上の実施例に関して、 $B/D$ および $C/D$ の比率である。2種類以上の対照を用いる場合、追加の比率は、有益なデータを与えるように得ることができる。これらの比率は、スポット群、単スポット、またはそれぞれのスポット下のそれぞれの画素について決定することができる。

【0074】最も好ましい態様においておよび上に挙げた例に関して、 $B/D$ および $C/D$ 強度比は、それぞれの画素について決定されるが、これは、いずれの色でもそれらの絶対強度とは無関係なはずである。言い換えると、 $B$ 対 $D$ のプロットは、例えば、それぞれのスポット下のそれぞれの画素について、直線の周りにばらつきを生じるはずであり、バックグラウンド補正が適切であるとしても、 $X$ および $Y$ 軸両方と0で交差するはずである。(適当なアルゴリズムは、ディスプレイ中のある与えられた標的スポットまたはスポット群の上で“クリックすること”によってこのようなプロットを生じることができる。)このプロットは、2種類の情報を示している。

【0075】第一に、線型回帰線の周りにばらつきの量は、データの品質を示すものであり、統計学的に評価して、理想的なスポットについては1である(すなわち、全ての画素値が回帰線上に来る)相関係数を生じることができる。1未満の値は、完全なデータより劣ることを示し、0.8またはそれ未満の値は、好ましくは、このようなスポットからのデータを疑わしいと考えるべきであるということを示すものとされる。このばらつきスポットは、単スポットまたはスポット群について生成することができる。第二に、この回帰線の勾配は、ある与えられたスポットまたはスポット群について、それぞれ $B/D$ または $C/D$ 強度比である。

【0076】所望の生物学的情報を抽出するために、その $B/D$ または $C/D$ 比を、好ましくは、対照スポットまたはスポット群に関して規格化するが、これら比率を、試験プローブ混合物中の既知のレベルのDNAまたはRNA配列に相関させることができる。これは、次のように行なわれる。

【0077】ゲノムDNAの分析には、組織DNA配列の大部分が、それらの標準コピー数、すなわち、ゲノム当たり2個(試験組織が男性ドナー由来である場合、性染色体からの配列を除く)で実際に存在していると仮定する。対照DNAについては、これが全ての配列(対照DNAが男性ドナー由来である場合、 $X$ または $Y$ 染色体からのものを除く)について真であると仮定する。これらの仮定に基づ

いて、ソフトウェアは全ての標的スポットのB/DまたはC/D比を比較し、極めて類似していると思われる比率群を選択する。この比率群は、試験組織中で標準である標的を示すと仮定され、その比率の平均を用いて他の比率を全て規格化する。言い換えると、全てのスポットのB/DまたはC/D比を、この“標準群”の平均B/DまたはC/D比それぞれで割る。したがって、全ての標準スポットのB/DまたはC/D比は1に近づくはずであるが、異数体である(2より大きいまたは少ないコピー数で存在する)標的からのB/DまたはC/D比は、約0.5またはそれ未満(欠失)または1.5以上(付加または増幅)であろう。

【0078】本発明の同時の発現およびゲノム分析組合せは、上記の比率を次のように用いることによって遺伝子コピー数への発現レベルの相関を可能にする。

【0079】Bが組織ゲノムDNAの強度であり、Cが組織mRNA(cDNA)の強度であり、そしてDが対照ゲノムDNAの強度である検定を行なったと仮定する。次に、得られる比率は次のようである。  
 $(B/D) = \text{バックグラウンドで補正された平均画素強度比 } (B_g/D_g) = \text{“標準”組のバックグラウンドで補正された平均画素強度比 } (B/D) / (B_g/D_g) = \text{規格化されたB/D比} = B_n/D_n$   
 $(C/D) = \text{バックグラウンドで補正された平均画素強度比 } (C_g/D_g) = \text{“標準”組のバックグラウンドで補正された平均画素強度比 } (C/D) / (C_g/D_g) = \text{規格化されたC/D比} = C_n/D_n$   
 $B_n/D_n$ 比は、ある与えられた標的配列のゲノムコピー数を示し、 $C_n/D_n$ 比は、ゲノム配列当りのmRNAコピーの相対数を示し、 $C_n/B_n$ 比は、相対mRNAコピー数が、ゲノムコピー数変化の相対変化と相関するかどうかを示すと考えられる。

(11)アレイの例本発明の方法において有用なマイクロアレイの種類を代表するものは、反復試験片を含まない約100個の標的要素の出生前アレイであって、これは、(a) (i) 全ヒトテロメアおよび(ii) 全ヒト動原体(腕pおよびq双方から得られる)の反復配列領域のすぐ隣のユニーク配列領域；(b) ディ・ジョージ(DiGeorge)、スミス・マジェニス(Smith-Magenis)、ダウン(Downs)、ウィリアムズ(Williams)、ヴェロカルディオフェイシャル(Velocardiofacial)、アラジル(Alagille)、ミラー・ディーカー(Miller-Dieker)、ウォルフ・ヒルシュホルン(Wolf-Hirschhorn)、ネコ鳴き(Cri du Chat)、ネコ眼(Cat Eye)、ランガー・ジーディオン(Langer-Giedion)、カルマン(Kallman)およびプラダー・ウィリ(Prader-Willi)/アンジェルマン(Angelman)症候群の“微少欠失”症候群領域；および(c) ステルススルファターゼ欠損症、筋ジストロフィーおよび男性不妊症で確認される欠失領域からのゲノムDNA配列、およびそれぞれの染色体上のサブテロメアのユニーク配列領域の欠失を伴う精神遅滞につながると考えられるものを含む。

【0080】表1は、このようなアレイにおいて有用なヒトゲノムDNAクローンを挙げる。この出生前アレイは、遺伝病を引き起こす多数の粗大染色体変化を確実に検出するその能力ゆえに、強力な医学的有用性を有する。ヒト出生前アレイは、割球および極体についての出生後試験、胎児細胞試験および着床前遺伝子試験についても有用である。表1には、染色体遺伝子座およびそれぞれの遺伝子座に相関する疾患が含まれる。

【0081】

【表1】

【表1】

表1

非癌遺伝病のコピー数異常を検出する出生前チップー遺伝子座

遺伝子または 染色体遺伝子座	細胞位置	疾患
1p テロメア	1p テロメア	精神遅滞、他
p58	1p36	1p36 欠失症候群
1 動原体付近		異数染色体性および部位マーカー
1q テロメア	1q テロメア	精神遅滞、他
2p テロメア	2p テロメア	精神遅滞、他
2 動原体付近		異数染色体性および部位マーカー
2q テロメア	2q テロメア	精神遅滞、他
3p テロメア	3p テロメア	精神遅滞、他
3 動原体付近		異数染色体性および部位マーカー
3q テロメア	3q テロメア	精神遅滞、他
4p テロメア	4p テロメア	精神遅滞、他
WHSCR/WHSC	4p16.3	ウォルフ・ヒルシュホルン症候群
4 動原体付近		異数染色体性および部位マーカー
4q テロメア	4q テロメア	精神遅滞、他
D5S23	5p 15.2	ネコ鳴き症候群
5p テロメア	5p テロメア	精神遅滞、他
5 動原体付近		異数染色体性および部位マーカー
5q テロメア	5q テロメア	精神遅滞、他
6p テロメア	6p テロメア	精神遅滞、他
6 動原体付近		異数染色体性および部位マーカー
6q テロメア	6q テロメア	精神遅滞、他
7p テロメア	7p テロメア	精神遅滞、他
7 動原体付近		異数染色体性および部位マーカー

【0082】

【表2】

【表2】

遺伝子または 染色体遺伝子座	細胞位置	疾患
7q テロメア	7q テロメア	精神遅滞、他
エラスチン	7q11.23	ウィリアムズ症候群
8p テロメア	8p テロメア	精神遅滞、他
8 動原体付近		異数染色体性および部位マーカー
8q テロメア	8q テロメア	精神遅滞、他
EXT1	7q24.1	ランガー・ジーディオン症候群
9p テロメア	9p テロメア	精神遅滞、他
9 動原体付近		異数染色体性および部位マーカー
9q テロメア	9q テロメア	精神遅滞、他
10p テロメア	10p テロメア	精神遅滞、他
10 動原体付近		異数染色体性および部位マーカー
10q テロメア	10q テロメア	精神遅滞、他
W1-8545	10p14-p13	ヴェロカルディオフェイシャル ／ディ・ジョージ症候群
11p テロメア	11p テロメア	精神遅滞、他
11 動原体付近		異数染色体性および部位マーカー
11q テロメア	11q テロメア	精神遅滞、他
12p テロメア	12p テロメア	精神遅滞、他
12 動原体付近		異数染色体性および部位マーカー
12q テロメア	12q テロメア	精神遅滞、他
13 動原体付近		染色体倍数性および部位マーカー
13q テロメア	13q テロメア	精神遅滞、他
RB1	13q14	三染色体性 13、他
14q テロメア	14q テロメア	精神遅滞、他
14 動原体付近		染色体倍数性および部位マーカー

【0083】

【表3】

【表 3】

遺伝子または 染色体遺伝子座	細胞位置	疾患
15q テロメア	15q テロメア	精神遅滞、他
15 動原体付近		
SNRPN	15q11-q13	ブラーダー・ヴィリ/ アンジェルマン症候群
D15S10	15q11-q13	ブラーダー・ヴィリ/ アンジェルマン症候群
16p テロメア	16p テロメア	精神遅滞、他
16 動原体付近		異数染色体性および部位マーカー
16q テロメア	16q テロメア	精神遅滞、他
17p テロメア	17p テロメア	精神遅滞、他
FLI1	17p11	スミス・マジェニス症候群
PMP22 または隣接	17p12	CMT1A/HNPP
D17S258	17p13	ミラー・ディーカー症候群/ 単離滑沢脳
LIS1	17p13	ミラー・ディーカー症候群/ 単離滑沢脳
17 動原体付近	17p13	異数染色体性および部位マーカー
17q テロメア	17q テロメア	精神遅滞、他
18 動原体付近		異数染色体性および部位マーカー
18p テロメア	18p テロメア	精神遅滞、他
18q テロメア	18q テロメア	精神遅滞、他
18p11.3 プローブ	18q11.3	トリ/イソ染色体 18p
19p テロメア	19p テロメア	精神遅滞、他
19 動原体付近		異数染色体性および部位マーカー
19q テロメア	19q テロメア	精神遅滞、他

【0084】

【表 4】

【表4】

遺伝子または 染色体遺伝子座	細胞位置	疾患
20p テロメア	20p テロメア	精神遅滞、他
JAG1	20p11	アラジル症候群
20 動原体付近		異数染色体性および部位マーカー
20q テロメア	20q テロメア	精神遅滞、他
21q テロメア	21q テロメア	精神遅滞、他
21 動原体付近		異数染色体性および部位マーカー
MNB または D21S55	21 q22.1	ダウン症候群
ERG	21 q22.1	ダウン症候群
22q テロメア	22q テロメア	精神遅滞、他
22q 動原体付近		ネコ眼症候群
GSCL	22 q11	ヴェロカルディオフェイシャル /ディ・ジョージ症候群
HIRA, TUPLE1	22 q11	ヴェロカルディオフェイシャル /ディ・ジョージ症候群
X/Y p テロメア	X/Y p テロメア	精神遅滞、他
STS	X p22.3	魚鱗癬、x連鎖
KAL	X p22.3	カルマン症候群
AR	Xq11-q12	異数染色体性および部位マーカー
XIST	Xq13.2	部位マーカー
ジストロフィン エクソン	Xp21	筋ジストロフィー
X/Y q テロメア	X/Y q テロメア	精神遅滞、他
SRY	Y p11.3	xx 男性等
AZFB	Yq11.2	男性不妊症/Yq マーカー
AZFC	Yq12	男性不妊症/Yq マーカー

【0085】もう一つの例は、表2で挙げられる52種類の癌遺伝子座または増幅遺伝子座それぞれのゲノム配列を含有するAmpliOnc™ゲノムDNA標的要素アレイである。

【0086】

【表5】

【表5】

表2

## Ampl i Onc遺伝子座

遺伝子または 染色体遺伝子座	細胞位置	癌関連
NRAS	1p13.2	乳房細胞系
MYCL1	1p34.3	小細胞肺癌細胞系, 神経芽腫細胞系
FGR	1p36.2-p36.1	
LAMC2	1q25-q31	乳房細胞系
REL	2p13-p12	非ホジキンリンパ腫
ALK	2p23	リンパ腫
MYCN(N-myc)	2p24.3-q24.1	神経芽腫
RAF1	3p25	非小細胞肺癌
TERC(hTR)	3q26	子宮頸部, 頭部および頸部, 肺
PIK3CA	3q26.3	卵巣
BCL6	3q27	リンパ腫
PDGFRA	4q11-q12	グリア芽細胞腫
MYB	6q22	結腸直腸; 白血病; 黒色腫
ESR1(ER, ESR)	6q25.1	乳房
EGFR(ERBB1, ERBB)	7p12.3-p12.1	グリオーマ; 頭部および頸部
PGY1,MDR1	7q21	薬物耐性細胞系
MET	7q31	胃
FGFR1,FLG	8p11.2-p11.1	乳房
MOS	8q11	乳房
ETO,MTG8,CBFA2T1	8q22	白血病
MYC(c-myc)	8q24.12-q24.13	小細胞肺, 乳房, 食道, 子宮頸部, 卵巣, 頭部および頸部等

【0087】

【表6】



【表6】

遺伝子または 染色体遺伝子座	細胞位置	癌関連
ABL1(ABL)	9q34.1	CML
FGFR2(BEK)	10q26	乳房
HRAS	11p15.5	結腸直腸, 膀胱
CCND1(サイクリン D1, BCL1)	11q13	頭部および頸部, 食道, 乳房, 肝, 卵巣
FGF4(HSTF1, HST)	11q13	乳房, 卵巣
FGF3(INT2)	11q13	乳房, 卵巣, 胃, 黒色腫, 頭部 および頸部
EMS1	11q13	乳房, 膀胱
GARP(D11S833E)	11q13.5-q14	乳房
PAE1	11q13.5-q14	乳房
MLL(ALL1)	11q23	白血病
KRAS2	12p12.1	結腸直腸, 胃, 腺上皮, 肺巨細胞
CCND2(サイクリン D2)	12p13	リンパ腫, CLL
TEL(ETV6)	12p13	白血病
WNT1(INT1)	12q12-q13	網膜芽腫
SAS;CDK4	12q13-q14	肉腫, グリオーマ
GL1	12q13.2-q13.3	肉腫, グリオーマ
MDM2	12q14.3-q15	肉腫, グリオーマ
AKT1	14q32.3	胃
PML	15q22	白血病
IGF1R	15q25-q26	希アンブリコン
FES	15q26.1	希アンブリコン
MRP	16p13.1	薬物耐性細胞系
MYH11	16p13.13-p13.12	白血病

【0088】

【表7】

【表7】

遺伝子または 染色体遺伝子座	細胞位置	癌関連
CBFB	16q22	白血病
RARA	17q12	白血病
HER-2/neu(EGFR2)	17q12-21	乳房, 卵巣, 胃
TOP2A	17q21-q22	
YES1	18p11.3	胃
BCL2-3' セグメント	18q21.3	非ホジキンリンパ腫
BCL2-5' セグメント	18q21.3	非ホジキンリンパ腫
INSR (インスリン 受容体)	19p13.2	乳房
JUNB	19p13.2	ヒール細胞系
CCNE(サイクリンE)	19q12	胃, 卵巣
BCL3	19q13	リンパ腫
AIB1	20q12	乳房
CSE1L(CAS)	20q13	乳房
MYBL2	20q13.1	乳房
PTPN1	20q13.1-q13.2	乳房
ZNF217(ZABC1)	20q13.2	乳房
STK15(BTAK, オーロラ2)	20q13.2	乳房, 卵巣, 結腸, 前立腺, 神経芽腫および子宮頸部
AML1(CBFA2)	21q22.3	白血病
BCR	22q11.21	白血病
EWSR1(EWS)	22q12	肉腫
PDGFB(SIS)	22q12.3-q13.1	横紋筋肉腫, 脂肪肉腫
AR	Xq11.2-q12	前立腺

注記：遺伝子の別名を括弧内に示す。

【0089】表2で挙げられたクローンに由来するゲノムDNA標的要素は、PAC、P1またはBACベクター中の約50kb—約200kbのヒトゲノムDNAインサートを含む。このアレイは、ベクター配列を分離することなく製造される。このアレイの使用は、これら癌遺伝子座それぞれのゲノム増幅、更には、これら領域をマッピングする遺伝子の発現の同時識別を可能にする。

【0090】さらに別の例は、AmpliOncIIアレイであり、これは、p53、RB1、WT1、APC、NF1、NF2、VHL、MEN1、MEN2A、DPC4、MSH2、MCH1、PMS1、PMS2、P57/KIP2、PTCH、BRCA1、BRCA2、P16/CDKN2、EXT1、EXT2、PTEN/MMAC1、ATMおよびTP73遺伝子のヒト腫瘍サプレッサー遺伝子座からのゲノムDNAによって補足された表2の癌遺伝子座からのゲノムDNAを含む。それらゲノムDNA標的要素は、ヒトゲノムライブラリーからこれら腫瘍サプレッサー遺伝子の遺伝子座をマッピングするゲノムDNAクローンを選択することによって製造される。この選択は、遺伝子座または遺伝子からのPCRプライマー対の製造、および引続きクローンを識別するライブラリースクリーニングによって行なわれる。この実施態様において、腫瘍サプレッサー遺伝子座のクローンは、約20kb—250kbの複雑度でありうるが、好ましくは、約50kb—約200kbである。

(12)発明の有用性本発明の方法は、遺伝的研究、ヒト疾患治療技術、ヒト疾患臨床研究、ヒト疾患薬物開発および薬理ゲノム学(pharmacogenomics)、ヒト遺伝子研究、動物用薬物開発、動物疾患治療技術、動物遺伝子研究、および植物遺伝子研究の分野でかなり有用である。特に、疑わしい癌組織をより正確に遺伝的に詳しく説明可能にすることにより、本発明は、より注文通りの診断および療法選択によって改良された疾患治療技術を提供するであろう。それら方法は、ウイルスの存在、染色体中へのウイルス組込み、およびウイルス遺伝子の発現を確認するのに用いることもできる。その方法を用いて、ヒトゲノムDNA異常、ヒト遺伝子発現、および細菌遺伝子の遺伝子発現を同時に検出することもできる。

【0091】本発明の方法は、癌および他の疾患のゲノム疾患治療技術に特に有用である。例えば、それら方法は、乳癌、前立腺癌、肺(小細胞または非小細胞)癌、卵巣癌、子宮頸癌、腎臓癌、頭部および頸部癌、膵臓癌、胃癌、脳癌、軟組織および皮膚癌、および白血病およびリンパ腫などの様々な血液またはリンパ系癌を含めた癌の遺伝子型および表現型を分類するのに有用である。腫瘍組織遺伝子型および表現型が本発明の方法によっていったん分類されると、医師

は、このデータを他の臨床データと組合せて、診断、予後、療法および療法への予想応答を決定することができる。

【0092】本発明の多色法によって与えられる性能は、薬物開発における迅速な比較試験を可能にする。例えば、癌細胞系に推定上の薬物化合物を用いて且つ望ましい時間間隔で投薬することができ、その後、細胞試料を取出すことができる。取出される細胞試料をそれぞれ、例えば、投薬後0時間、10時間、20時間および30時間に集め、核酸抽出処理をした後、核酸を別々のフルオル(fluor)でそれぞれ標識する。次に、それら4種類の集団を適当な対照と一緒にアレイに適用する。このようにして、発現および初期染色体状態への薬物の経時追跡作用を評価する。染色体変化は、概して、より長期間にわたって起こり、この実施例中に変化するとは考えられない。その方法は、特に、遺伝子増幅によって薬物耐性を生じることがありうるような薬物耐性細胞系において薬物効力を評価するのに適用することもできる。

【0093】

【実施例】次の実施例は、本発明を単に詳しく説明するためのものであり、制限すると解釈すべきではない。

実施例1(A)方法(i)試験アレイ製造:4インチ×4インチのクロム被覆プレート(Nanofilm)は、U. S. Precision Glass Company(エルジン, イリノイ州)によって刻みをつけられ、その刻みは24の等寸のチップに印をつけた。180標的要素マイクロアレイをそれぞれのチップ上に製造した。核酸付着の前に、そのプレートを、蒸留水、イソプロパノール、メタノールおよび蒸留水で連続して洗浄し、乾燥させ、室温まで平衡させた。そのマイクロアレイは各チップの中央に置かれ、チップ表面の約5mm×6mmを占めた。そのマイクロアレイは、New Precision Technologies(ノースブルック, イリノイ州)によって供給された計算機制御された単針流体付着ロボットを用いて製造された。そのロボットは、レーザーによるZ軸制御器、付着ピンに掛けられた圧力調整用窒素ガスライン、および12個の4"×4" プレートを持する大きさの定盤を加えることによって変更された。そのロボットは、EFD製のLuerロックシリンジ先端に連結されたそれぞれが33ゲージ、1インチ長さの鋼製細管注射針である多数の付着ピンを用いた。それら細管ピンにはそれぞれ、異なったゲノムDNAを針のルア(Luer)ロック部分に充填することによって充填した。その針は、定盤上の全てのチップ上にそれぞれの標的要素を付着後に手動によって交換した。マイクロアレイは、標的要素中心間がXおよびY両方向に約400ミクロン間隔となるように製造された。

【0094】ロボットは、そのロボットと一緒に与えられた計算機ソフトウェアで制御されたが、細管ピンをチップ表面と接触させるように、しかも接触時にそのピンの上に微量噴出窒素圧を与えるように変更された。接触および微量噴出時間は、標的要素当り約10ミリ秒であった。ガス圧は約1psiであり、必要に応じて手動調節されて、充分な量の粘稠なゲノムDNAをピンから押出した。制御条件は、約0.3nl/スポットの100mm NaOH中1g/l核酸を付着させるように設定された。付着した要素はほぼ円形であり、DAPI染色後の顕微鏡検査下で容易に目につく変形を伴った。スポット寸法は、DNAの粘度によっても異なった。個々のチップを手動で分離した。

【0095】マイクロアレイは、31個のヒトの推定上の増幅遺伝子座からのゲノムDNAを含むスポット、1個の全ヒトゲノムDNAスポット、それぞれのスポットがこれら癌遺伝子座の内10個のゲノムDNAの等量のプールであるプールされたゲノムDNAの3個の対照スポット、および1個のファージDNAスポットを含んだ。これら36スポットをマイクロアレイ上で各5回繰返して180個のスポットのマイクロアレイを製造した。31個のヒトの推定上の増幅遺伝子座を以下に挙げるが、これらは、BAC、PACまたはPIクローニングベクター中に挿入されたゲノムヒトDNAであった。これら遺伝子座のゲノムDNAそれぞれを、単BAC、PACまたはPIクローンのDNAを用いて製造したが、個々のインサート寸法は一定ではなかった。これらBACクローンは、入手可能なゲノムライブラリーを次のような遺伝子座それぞれのプライマー配列を用いてスクリーニングすることによって得られた。

【0096】

【表8】

【表8】

遺伝子座	クローン番号	ライブラリー源 <sup>1</sup>
MYCL1	RMC01P052	UCSF
FGR	RMC01P057	UCSF
REL	BAC-274-P9	GS
N-MYC	PAC-254-N16	GS
RAF1	BAC-98-L2	GS
PIK3CA	PAC-97-B16	GS
PDGFRA	BAC-819-M20	GS
MYB	BAC-268-N4	GS
EGFR	BAC-246-M20	GS
MET	BAC-54-J7	RG
FLG	BAC-566-K20	GS
C-MYC	P1-469	GS
ABL	PAC-763-A4	RG
BEK	BAC-126-B28	GS
HRA51	BAC-137-C7	GS
BCL1	PAC-128-18	GS
INT2	BAC-36-F16	GS
KRAS	BAC-490-C21	GS
WNT1	BAC-400-H17	GS
GLI	RMC12P001	UCSF
CDK4	BAC-561-N1	GS
MDM2	BAC-82-N15	GS
AKT1	BAC-466-A19	GS
FES	P11-2298	GS
HER2	P1-506	GS
YES1	BAC-8-P19	GS
JUNB	BAC-104-C10	GS
20q13.2	BAC-97	GS
PDGFB	RMC22P003	UCSF
AR	PAC-1097-P11	RG

<sup>1</sup>GSは Genome systems であり; RGは Research Genetics であり; UCSF は、LBL/UCSF Resource for Molecular Cytogenetics, University of California, San Francisco, Cancer Center である。それぞれの遺伝子座のクローン番号を示す。ヒトインサート寸法は約60kb-約212kbであったが、全てのインサートを測定したのではなかった。それぞれの染色体遺伝子座は上の表2にある。

【0097】(ii) 組織抽出および標識付け: ATCCから入手したSJSA-1およびColo320細胞系それぞれについて、それら細胞4℃において7,000rpmで遠心分離して細胞ペレットを生じた。上澄みを捨てた。それらペレットを、Stratagene製のDNA Extraction KitのSolution #2中に再懸濁させた。それらペレットは、機械的ホモジナイザーを中位の設定で用いて均一化された。プロナーゼを加えて、各試験管中で100i g/mlのプロナーゼ濃度にした。それら試験管を60℃で振とうしながら1時間インキュベートした。試験管を氷上に10分間置いた。Stratagene DNA Extraction Kit Solution #3を加え、それら試験管を再度氷上に5分間置いた。試験管を4℃において8,000rpmで15分間遠心分離してタンパク質沈殿をペレット化した。その上澄みをデカントした。RNアーゼをその上澄みに加えて20i g/mlのRNアーゼ濃度にし、その上澄みを37℃で15分間インキュベートした。2倍容量のエタノールを加えた後、10,000rpmで15分間遠心分離した。上澄みをデカントした。それらDNAペレットを、Speed Vacを用いた真空下で乾燥させた。それらDNAペレットを水中に再懸濁させ、995i lの50mM水酸化ナトリウムを加えた。

【0098】Amersham(アーリントン・ハイツ, イリノイ州)からのCy-5dUTPおよびCruickshankによって製造されたフルオレセイン標識dCTPを、抽出されたDNAを標識するニックトランスレーションで用いた。SJSA-1取込みのためのCy-5dUTPのニックトランスレーションには、Promega(マディソン, ウィスコンシン州)ニックトランスレーションキットを用いる標準的なプロトコルを用いた。Colo320については、10i lのニックトランスレーション酵素および5i lのニックトランスレーション緩衝液(両方ともVysis, Inc. 製)を、1i gの抽出Colo320 DNA、各4i lのdATP、dGTPお

よびdTTP、1i lのdCTP、2i lのCruickshankによって製造されたフルオレセインdCTP、および50i lの溶液を生じるための十分な水と混合した。その混合物を37°Cで30分間インキュベートした。その酵素は80°Cで10分間加熱することによって熱失活した。その溶液をG-25 Spin Columnで精製し、標識されたプローブをSpeed Vac. で40分間乾燥させた。

【0099】(iii) ハイブリダイゼーション: ニックトランスレーションされたDNA(各415ng)、対照DNA(415ngのSpectrumOrange Total Human DNA(Vysis, Inc.))およびCot-1 DNA(100i g)(LTI, ベセスダ, メリーランド州)を、約15i lのLSI Hybridization Buffer(Vysis, Inc.)と混合して、25i lのハイブリダイゼーション混合物を生じた。そのハイブリダイゼーション混合物を、図1-5で示されているチップホルダー中に入っているチップ上にピペットで移した。そのチップを、RTV103シリコンゴムシーラント(GE, ウォーターフォード, ニューヨーク州)を用いてホルダー中の適所に接着した。図1-5のプローブクリップ33を上記のように用いた。次に、ホルダーを密閉給湿室内において37°Cで一晩中インキュベートした。ハイブリダイゼーション後、そのプローブクリップを除去し、そのチップを、2×SSCを用いて室温で5分間、2×SSCおよび50%ホルムアミドを用いて40°Cで30分間、そして次に、2×SSCを用いて室温で10分間洗浄した。洗浄されたチップを暗所において室温で乾燥させた。10i lのGEL/Mount™およびDAPIを加え、18mm×18mmガラスカバークリップをホルダー中のアレイ上に置いた。

【0100】(iv) 画像捕捉および分析: Cheのブレットボード画像化装置を用いて、ハイブリッド形成されたアレイの大視野画像をアレイ窓によってプローブクリップまたはカバースリップを除去することなく捕捉した。ブレットボード画像には二重フィルターホイール(Ludi)が含まれ、DAPI、フルオレセイン、SpectrumOrangeおよびCy5それぞれのための単バンドパスフィルター(Chroma Technology, バトルボロ, バーモント州)を励起および発光に用いた。画像データは、次の工程を実施するMacintosh計算機作動アルゴリズムを用いて処理された。(1)各標的要素スポットをDAPI画像から配置し、そのグリッド位置を割当て; (2)各スポットの各フルオルの蛍光強度を測定する; (3)モード、メディアンおよび質量による蛍光比を各スポットについて計算する; (4)スポット寸法および強度域値に基づく排除判定基準; (5)複合画像を作成し、計算機モニターで表示する; (6)表示される画像には、各スポットの周りに描かれた白色環およびグリッド位置の数が含まれる; (7)慣用的な計算機によるプリンターの印刷性能、および(8)生および処理データおよび画像記憶。

(B) 結果対照と比較されるColo320の蛍光比を表3に示す。表3に示されるように、癌遺伝子CMYCをColo320細胞中で32倍に増幅させた。これは、29±6倍(公開データの平均から計算される)のColo320中で知られているCMYCの増幅に匹敵する。ハイブリダイゼーション結果のプロソイドカラー複合画像は、CMYC要素の有意の色強度を示し、CMYC遺伝子座の増幅も示した。表4は、対照と比較されるSJSA-1細胞についての蛍光比分析結果を示す。表4は、GLI(9.4倍)、MDM2(7.5倍)およびCDK4/SAS(12.1倍)遺伝子座がSJSA-1細胞中でそれぞれ増幅されることを示している。ハイブリダイゼーション結果のプロソイドカラー複合画像は、GLI、MDM2およびCDK4/SAS要素の有意の色強度を示し、増幅も示した。表5は、大部分の標的のSJSA-1シグナルと比較されるColo320シグナルの蛍光比が約1であることを示している。しかしながら、GLI(0.12)、MDM2(0.13)およびCDK4/SAS(0.09)のより低い比率は、これら遺伝子座が、Colo320細胞に相対してSJSA-1細胞中で増幅されたことを示している。標的CMYC(40)の高い比率は、Colo320細胞中でのCMYC増幅を示している。一つのチップに同時にハイブリッド形成した3種類のプローブ(二つの試料プローブおよび一つの対照プローブ)で認められた遺伝子増幅は、SJSA-1およびColo320のDNAの別々のチップへの別々のハイブリダイゼーションによって得られるものと同様であった。(データ収集後、AKT2遺伝子座のクローンが正しくマッピングされなかったことが判った。したがって、AKT-2標的要素について表3、4および5、および図6-13で示されているデータは無意味である。)

この実施例1は、3種類以上の別々に標識された核酸集団の同一アレイへの比較ハイブリダイゼーションについて出願人が承知している最初の実例である。これら結果は、組織核酸の状態を検出するためのマイクロアレイへの3種類の別々に標識された核酸集団の同時ハイブリダイゼーションを示している。

【0101】

【表9】

【表9】

表3. 実施例1のハイブリダイゼーション結果についての試験/対照比分析  
C o l o 3 2 0細胞中でのCMYC増幅を認めた。

標準比：(モード)			(メディアン)			(質量)			
標識	名称	#	(平均Cu)		(平均Cu)		(平均Cu)		補正C.
1	THD	5	( 0.98	4%)	( 1.04	3%)	( 1.02	3%)	0.951
2	Lamb	5	( 1.99	23%)	( 2.47	13%)	( 2.01	36%)	0.446
3	PDGFB	5	( 0.81	11%)	( 0.96	3%)	( 0.96	3%)	0.934
4	EGFR	5	( 0.83	12%)	( 0.97	3%)	( 0.94	3%)	0.880
5	PDGFRA	5	( 0.68	4%)	( 0.86	2%)	( 0.83	2%)	0.969
6	MYB	5	( 0.68	12%)	( 0.75	6%)	( 0.75	4%)	0.941
7	WNT 1	5	( 1.21	6%)	( 1.29	3%)	( 1.29	3%)	0.973
8	HRAS 1	5	( 1.48	9%)	( 1.70	5%)	( 1.65	4%)	0.961
9	MET	5	( 0.80	15%)	( 0.91	2%)	( 0.90	3%)	0.940
10	BEK	5	( 0.61	5%)	( 0.77	14%)	( 0.75	10%)	0.943
11	HER2	5	( 1.11	10%)	( 1.22	3%)	( 1.16	1%)	0.956
12	BCL 1	5	( 0.68	6%)	( 0.75	4%)	( 0.75	3%)	0.961
13	YES 1	5	( 0.85	3%)	( 0.94	1%)	( 0.93	1%)	0.970
14	RAF1	5	( 0.91	28%)	( 1.09	2%)	( 0.99	4%)	0.931
15	GLI	5	( 1.04	7%)	( 1.15	2%)	( 1.16	3%)	0.949
16	MDM2	5	( 0.88	4%)	( 0.97	3%)	( 0.98	3%)	0.968
17	C-MYC	5	(28.74	6%)	(33.37	4%)	(32.30	2%)	0.978
18	20Q13.2	5	( 0.77	6%)	( 0.88	5%)	( 0.86	3%)	0.976
19	REL	5	( 0.97	2%)	( 1.07	2%)	( 1.04	2%)	0.946
20	MYCL1	5	( 0.99	9%)	( 1.14	5%)	( 1.09	4%)	0.957
21	FGR	5	( 0.92	21%)	( 0.94	3%)	( 0.93	2%)	0.970
22	FES	5	( 0.87	7%)	( 0.98	4%)	( 0.96	4%)	0.962
23	ABL	5	( 1.12	10%)	( 1.33	6%)	( 1.25	1%)	0.947
24	INT2	5	( 0.72	4%)	( 0.86	4%)	( 0.84	3%)	0.952
25	PIK3CA	5	( 0.83	11%)	( 0.89	3%)	( 0.87	7%)	0.952
26	N-MYC	5	( 1.02	5%)	( 1.13	2%)	( 1.12	2%)	0.792
27	AKT2	5	( 1.15	7%)	( 1.21	4%)	( 1.22	4%)	0.964
28	FLG	5	( 1.03	8%)	( 1.12	5%)	( 1.12	4%)	0.913
29	JUNB	5	( 0.92	4%)	( 0.99	1%)	( 0.97	1%)	0.834
30	AKT1	5	( 1.01	2%)	( 1.06	4%)	( 1.03	2%)	0.906
31	KRAS	5	( 0.90	11%)	( 1.02	6%)	( 1.00	6%)	0.985
32	CDK4	5	( 1.02	5%)	( 1.17	2%)	( 1.12	2%)	0.958
33	A.R	5	( 0.78	4%)	( 0.85	2%)	( 0.84	3%)	0.961
34	c1	5	( 0.96	9%)	( 1.12	7%)	( 1.10	7%)	0.852
35	c2	5	( 4.94	22%)	( 5.68	11%)	( 5.27	9%)	0.957
36	c3	5	( 0.93	3%)	( 1.01	2%)	( 1.01	1%)	0.976
全体		178		9%		4%		4%	0.928
規格化群			0.40		0.38		0.37		

【0102】

【表10】

【表10】

表4. 実施例1のハイブリダイゼーション結果についての試験/対照比分析  
SJS A-1細胞中でのGLI、MDM2およびCDK4/SAS増幅を認め

標準比: (モード)		(メディアン)		(質量)		補正C.
標識	名称	μ	(平均Cu)	(平均Cu)	(平均Cu)	
1	THD	5	( 1.39 3%)	( 1.15 2%)	( 1.18 3%)	0.976
2	Lamb	5	( 0.93 18%)	( 0.65 18%)	( 0.61 57%)	0.983
3	PDGFB	5	( 1.21 8%)	( 0.98 4%)	( 0.99 2%)	0.973
4	EGFR	5	( 1.40 16%)	( 1.14 6%)	( 1.15 4%)	0.968
5	PDGFRA	5	( 1.25 3%)	( 0.98 2%)	( 0.99 2%)	0.988
6	MYB	5	( 1.24 11%)	( 1.01 6%)	( 1.06 4%)	0.980
7	WNT 1	5	( 1.30 6%)	( 1.04 4%)	( 1.03 4%)	0.978
8	HRAS 1	5	( 1.15 7%)	( 0.91 7%)	( 0.93 5%)	0.980
9	MET	5	( 1.31 6%)	( 1.00 4%)	( 1.03 3%)	0.977
10	BEK	5	( 1.25 5%)	( 0.92 6%)	( 0.92 8%)	0.941
11	HER2	5	( 1.12 2%)	( 0.85 1%)	( 0.90 2%)	0.976
12	BCL 1	5	( 2.49 4%)	( 1.94 4%)	( 1.96 3%)	0.987
13	YES 1	5	( 1.32 2%)	( 1.09 1%)	( 1.08 1%)	0.988
14	RAF1	5	( 1.20 10%)	( 0.92 4%)	( 1.01 1%)	0.969
15	GLI	5	( 11.55 4%)	( 9.18 2%)	( 9.39 3%)	0.982
16	MDM2	5	( 10.21 11%)	( 7.39 12%)	( 7.61 10%)	0.976
17	C-MYC	5	( 1.03 4%)	( 0.81 2%)	( 0.81 2%)	0.984
18	20Q13.2	5	( 1.14 8%)	( 0.98 3%)	( 0.99 2%)	0.983
19	REL	5	( 1.27 2%)	( 1.06 2%)	( 0.99 13%)	0.821
20	MYCL1	5	( 1.40 4%)	( 1.09 3%)	( 1.13 1%)	0.987
21	FGR	5	( 1.23 5%)	( 0.97 3%)	( 0.99 3%)	0.986
22	FES	5	( 1.19 2%)	( 0.95 2%)	( 0.94 2%)	0.979
23	ABL	5	( 0.92 12%)	( 0.67 18%)	( 0.71 10%)	0.968
24	INT2	5	( 1.78 4%)	( 1.44 2%)	( 1.50 2%)	0.980
25	PIK3CA	5	( 1.03 5%)	( 0.88 5%)	( 0.85 7%)	0.745
26	N-MYC	5	( 1.47 5%)	( 1.24 2%)	( 1.16 1%)	0.987
27	AKT2	5	( 1.23 6%)	( 1.01 3%)	( 1.03 3%)	0.968
28	FLG	5	( 1.66 5%)	( 1.35 1%)	( 1.35 1%)	0.956
29	JUNB	5	( 1.26 4%)	( 1.01 1%)	( 1.03 3%)	0.949
30	AKT1	5	( 1.11 2%)	( 0.91 2%)	( 0.92 3%)	0.972
31	KRAS	5	( 1.23 11%)	( 1.05 2%)	( 1.06 1%)	0.989
32	CDK4	5	( 15.46 5%)	( 11.69 6%)	( 12.06 2%)	0.976
33	A-R	5	( 0.98 3%)	( 0.77 2%)	( 0.77 2%)	0.986
34	c1	5	( 1.44 9%)	( 1.16 3%)	( 1.19 2%)	0.951
35	c2	5	( 3.71 15%)	( 2.68 6%)	( 3.01 5%)	0.978
36	c3	5	( 4.09 2%)	( 3.29 3%)	( 3.33 2%)	0.989
全体		176	6%	4%	5%	0.954
規格化群			1.00	1.20	1.21	

【O103】

【表11】

【表11】

表5. 実施例1のハイブリダイゼーション結果についての試験/対照比分析  
 SJS A-1細胞中でのGLI、MDM2およびCDK4/SAS増幅および  
 Colo320細胞中でのCMYC増幅を認めた。

標準比: (モード)			(メディアン)	(質量)	補正C.		
標識	名称	#	(平均Cu)	(平均Cu)	(平均Cu)		
1	THD	5	( 0.92 8%)	( 0.91 5%)	( 0.88 4%)	0.934	
2	Lamb	5	( 3.24 0%)	( 4.05 21%)	( 4.39 52%)	0.228	
3	PDGFB	5	( 0.88 8%)	( 0.98 5%)	( 0.97 2%)	0.904	
4	EGFR	5	( 0.70 11%)	( 0.88 7%)	( 0.85 6%)	0.856	
5	PDGFRA	5	( 0.77 6%)	( 0.91 13%)	( 0.86 4%)	0.963	
6	MYB	5	( 0.82 3%)	( 0.77 11%)	( 0.72 3%)	0.936	
7	WNT 1	5	( 1.14 8%)	( 1.24 2%)	( 1.28 8%)	0.919	
8	HRAS 1	5	( 1.58 12%)	( 1.96 12%)	( 1.82 9%)	0.944	
9	MET	5	( 0.77 13%)	( 0.91 6%)	( 0.90 6%)	0.928	
10	BEK	5	( 1.22 94%)	( 1.06 19%)	( 0.90 19%)	0.823	
11	HER2	5	( 1.20 11%)	( 1.48 3%)	( 1.31 2%)	0.933	
12	BCL 1	5	( 0.3 10%)	( 1.38 8%)	( 0.88 2%)	0.979	
13	YES 1	5	( 0.83 4%)	( 0.85 2%)	( 1.00 4%)	0.902	
14	RAF1	5	( 1.10 16%)	( 1.22 2%)	( 0.12 3%)	0.937	
15	GLI	5	( 0.12 2%)	( 0.13 2%)	( 0.13 13%)	0.960	
16	MDM2	5	( 0.12 11%)	( 0.14 17%)	( 40.45 2%)	0.967	
17	C-MYC	5	(36.47 6%)	(43.14 10%)	( 0.89 2%)	0.928	
18	20Q13.2	5	( 0.88 6%)	( 1.00 2%)	( 1.02 2%)	0.969	
19	REL	5	( 0.98 6%)	( 1.06 8%)	( 0.98 5%)	0.959	
20	MYCL1	5	( 0.93 13%)	( 0.96 5%)	( 0.96 5%)	0.949	
21	FGR	5	( 0.88 6%)	( 1.04 5%)	( 1.03 3%)	0.948	
22	FES	5	( 0.99 7%)	( 2.18 27%)	( 1.99 30%)	0.926	
23	ABL	5	( 2.00 39%)	( 0.60 5%)	( 0.57 5%)	0.924	
24	INT2	5	( 0.57 8%)	( 1.00 6%)	( 1.05 4%)	0.925	
25	PIK3CA	5	( 1.44 70%)	( 1.01 1%)	( 0.99 3%)	0.959	
26	N-MYC	5	( 0.91 9%)	( 1.18 2%)	( 1.20 2%)	0.906	
27	AKT2	5	( 1.15 9%)	( 0.83 4%)	( 0.84 4%)	0.865	
28	FLG	5	( 0.85 12%)	( 0.98 3%)	( 0.97 3%)	0.918	
29	JUNB	5	( 0.97 5%)	( 1.17 3%)	( 1.15 2%)	0.893	
30	AKT1	5	( 1.21 6%)	( 0.96 9%)	( 0.96 7%)	0.968	
31	KRAS	5	( 0.91 9%)	( 0.11 9%)	( 0.09 3%)	0.950	
32	CDK4	5	( 0.09 4%)	( 1.08 2%)	( 1.12 1%)	0.960	
33	A.R	5	( 1.00 6%)	( 0.99 5%)	( 0.93 3%)	0.824	
34	c1	5	( 0.33 11%)	( 2.40 8%)	( 1.78 5%)	0.353	
35	c2	5	( 2.68 18%)	( 0.31 5%)	( 0.31 3%)	0.966	
36	c3	5	( 0.29 3%)				
全体			180	13%	7%	7%	0.954
規格化群			0.31	0.32	0.30		

【0104】実施例2(A)方法(i)アレイ:実施例1と同様の180要素マイクロアレイを用いた。

【0105】(ii)組織抽出および標識付け:この実験では、共にATCCからの2種類の細胞系Colo320およびK562を用いた。それぞれ5百万個の細胞を回転させて(1. 5K, 10分間)ペレット化した。デカントした後、100 $\mu$ lのRNアーゼ溶液および300 $\mu$ lの溶解溶液をそのペレットに加え、その混合物を高速で簡単に回転させた。それぞれの細胞系のmRNAを、ニトロセルロースポリTによって、製造者(アンビオン、テキサス州)によって与えられた単離プロトコルを用いて単離した。

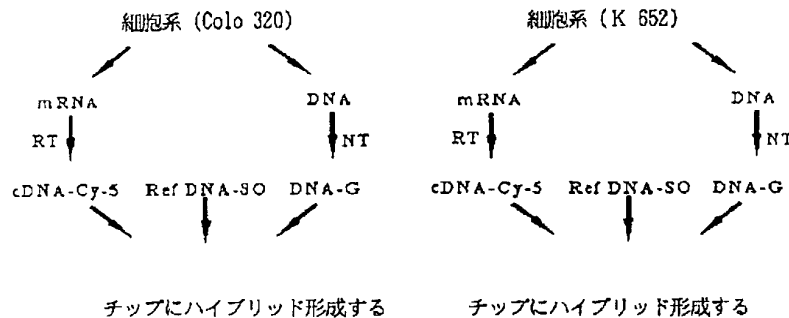
【0106】単離されたmRNAをエタノール沈殿させ、Cy-5-dCTP(Amersham)の存在下において慣用的なプロトコルを用いて逆転写し、ランダムpN9によって開始されてCy5標識cDNAプローブを製造し、その5分の1をそれぞれのハイブリダイゼーション検定に用いた(各検定につき100万個の細胞)。DNAをそれぞれの細胞系について、慣用的なフェノールクロロホルム抽出を用いて単離し、実施例1の場合のようにフルオレセインdCTPの存在下においてニックトランスレーションを用いて標識してgDNAを生じた。

【0107】(iii)ハイブリダイゼーション:ハイブリダイゼーションはそれぞれ、15 $\mu$ lのLSIハイブリダイゼーション緩衝液(Vysis, Inc.), 200ngの細胞系gDNAプローブ、200ngの細胞系cDNAプローブ、対照として200ngのSpectrumOrange Total Human Genomic DNA(Vysis, Inc.), 20 $\mu$ gのサケ精子DNAおよび40 $\mu$ gのCot-1 DNAから成る25 $\mu$ lの全容量においてであった。ハイブリダイゼーションは、実施例1の場合のようにプローブチップを含むチップホルダー中のマイクロアレイに対してであり、密閉給湿室内において42°Cで3日間行なわれた。各細胞系について、ハイブリダイゼーションは二つのチップで二重に試験された。全工程を下に示す。

【0108】

【化1】





【0109】(iv) 画像捕捉およびデータ分析: ハイブリッド形成されたチップの蛍光画像を、実施例1の場合のようにCheのブレードボード二重フィルターホイール画像化システムを用いて得、分析した。単バンドパスフィルターを励起および発光両方に用いた。画像は、実施例1の場合と同様にソフトウェアを用いて分析した。

(B) 結果図面の一般的な説明: データは、散布図および/または棒グラフとして示されている。特定の標的クローンに該当するそれぞれの点を含む散布図は、データセットの統計学的表現として役立つ。任意の与えられた標的クローンについての情報は、棒グラフから抽出することができる。

【0110】(i) シグナル強度: ミクロアレイ中の遺伝子についてのバックグラウンド補正されたシグナルの強度は、組織cDNA(10秒間暴露で165カウントの平均値)と組織gDNA(10s暴露で187カウントの平均値)との間で同様であった。cDNA検出に関係したバックグラウンドは、gDNAの73カウントと比較したところ、より高い132カウントであった。cDNAおよびgDNA双方に関して、最も弱いシグナルでさえも、十分なプローブがチップ上に付着しているという条件ならば、60秒間暴露で十分にバックグラウンドを越えた( $S/B > 1$ )。

【0111】(ii) データ信頼度: 図6は、細胞系それぞれについて2回のハイブリダイゼーションから得られたゲノムDNAハイブリダイゼーションデータの相関を示す。Colo320およびK562についてのデータの線型回帰相関は、それぞれ0.9963および0.9999であり、データについて高い信頼度を示す。予想されるように、ヒト対照gDNAに対する組織gDNAの比率は、大部分の標的要素遺伝子の集落を形成した(規格化後のものの周囲)。その集落から遠く隔たった比率は、該当する遺伝子の細胞系中での遺伝子増幅を示している(Colo320中のCMYCおよびK562中のABL)。試験された両方の細胞系について、“標準”集落が0.5-1.5の比率範囲にわたると示されていることは興味深い。この範囲内の比率の値は、実験間で極めて再現性があり、それらは、欠失するまたは増幅されるこの集落内の任意の特定の遺伝子を識別することは信頼できないと考えられるように分布していた。

【0112】図7は、各細胞系について2回のハイブリダイゼーションから得られた遺伝子発現ハイブリダイゼーションデータの信頼度を示す。Colo320およびK562についての2組のデータの線型回帰相関は、それぞれ0.9989および0.9790であった。

【0113】(iii) 検定多重性: 図8(K562細胞系について)および図9(Colo320細胞系について)は、新規検定形式を用いて得られた検定多重性を示す。別々のゲノムDNA検定を用いると、標的配列(緑色棒)のゲノムコピー数(ヒト対照に相対する)のみを検出しようと考えられる。発現cDNA検定を用いると、発現プロファイル(赤色棒の若干当量)を検出するだけでありうと考えられる。本発明の方法を用いると、ゲノムおよび発現データが同時に得られた。

【0114】(iv) 発現検定の対照としての標準ヒト全gDNAの使用: 通常は、“普遍的”すなわち“標準”対照がないので、2種類の試料の発現レベルは、それら2種類の試料の発現検定を別の検定において同一チップで行なう場合にのみ信頼して比較することができる。実施例2は、発現検定のための対照核酸として全標準ヒトgDNAを用いた。異なった色の蛍光色素で標識された組織cDNAおよび対照gDNAを用いる場合、ハイブリダイゼーション後、それら二つの色の蛍光強度比は、プローブ溶液中のcDNAおよび対照gDNAの初期濃度比を反映しているはずである。特定の対照gDNAが容易に入手可能であり、しかもその遺伝子特異的配列のコピー数が変化しない(すなわち、“安定”している)または無視しうる変化しかないならば、それを全ての発現検定の普遍的対照として用いることができる。その発現プロファイルは、図10で示されるように、対照gDNAに対するcDNAの比率として表すことができる。この比率プロファイルは、いろいろある試料に依存性であるにすぎない。言い換えると、同一試料の2回の発現検定を、同一アレイを含む2種類の異なったチップ上において2回の別々のハイブリダイゼーションで行なうならば、それら2回の検定から得られる発現プロファイルは、全ての標的について一定であるスケーリング因子によってのみ異

なるはずである。種々の試料は、異なった発現プロフィール(対照ゲノムDNAに対する比率として表される)を示すであろう。図7および10の比較は、それら発現プロフィールが、実際に、いろいろある試料に依存性であるにすぎないことを示している。本発明の方法において発現分析の対照として全ヒトゲノムDNAを用いると、種々の試料の発現プロフィールは、それら検定が別個に且つ独立して行なわれるとしても比較することができる。

【0115】(v) 遺伝子過発現へのゲノム増幅の相関: 図11および12は、K562およびColo320細胞系それぞれについてのゲノムコピー数対cDNA(両方とも対照ゲノムDNAに相対する)のプロットである。

【0116】予想されるように、細胞系内では、増幅された遺伝子がなければ、分析される遺伝子の残りの遺伝子の発現レベルは広く異なったが、それらのゲノムコピー数は比較的一定に維持される。図10で示されるように、両方の細胞系において、JUNB、HRAS1、GLIなどの若干の遺伝子についてのcDNAはより豊富であるが、PDGFRA、BEK、MDM2などのその他のcDNAはあまり豊富でない。有意には、C-MYCおよびABLについて、それらの発現レベルは2種類の細胞について極めて異なり、その傾向は、ゲノムレベルでのそれらの増幅に従う。Colo320中でのC-MYCおよびK562中でのABLの過発現は、遺伝子増幅に起因することがありうる。図13は、それら2種類の細胞系の間の“遺伝子発現”比対“遺伝子コピー数”比のプロットである。興味深いことに、それら二つの数の間には顕著な相関があった。(線型回帰結果、 $Y=0.262X+0.724$ , 相関0.985)。グラフ中において、両方の細胞系中で増幅されない遺伝子は集落を形成するが、2種類の細胞系中で不釣合に増幅される遺伝子は、その集落とは別に隔たてられている。このグラフ、またはより一般的には、同時ゲノムおよび発現検定は、過発現または発現不十分が確かに遺伝子増幅または欠失によるものとするのを助ける。

【0117】本出願明細書は、発明の範囲を制限するためのものではない。本明細書中に引用される特許、特許出願および公表された参考文献は全て、本明細書中に援用される。本発明の範囲は、請求の範囲によって決定され、それらの同等物はいずれも全て含まれる。

## 図の説明

### 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明の方法を実施する場合に用いるのに好ましいハイブリダイゼーションカートリッジの成分を示す。

【図2】図2は、本発明の方法を実施する場合に用いるのに好ましいハイブリダイゼーションカートリッジの成分を示す。

【図3】図3は、本発明の方法を実施する場合に用いるのに好ましいハイブリダイゼーションカートリッジの成分を示す。

【図4】図4は、本発明の方法を実施する場合に用いるのに好ましいハイブリダイゼーションカートリッジの成分を示す。

【図5】図5は、本発明の方法を実施する場合に用いるのに好ましいハイブリダイゼーションカートリッジの成分を示す。

【図6】図6は、それぞれがヒト癌細胞系に由来する組織cDNAおよびゲノムDNA集団であって、一方は赤色で標識され、他方は緑色で標識されたもの、および橙色で標識された全ヒトゲノムDNA対照集団とのハイブリダイゼーション後の核酸マイクロアレイからのデータを示し、これらは、同一核酸マイクロアレイで遺伝子発現および染色体異常両方を同時検出する本発明の方法の性能を示している。

【図7】図7は、それぞれがヒト癌細胞系に由来する組織cDNAおよびゲノムDNA集団であって、一方は赤色で標識され、他方は緑色で標識されたもの、および橙色で標識された全ヒトゲノムDNA対照集団とのハイブリダイゼーション後の核酸マイクロアレイからのデータを示し、これらは、同一核酸マイクロアレイで遺伝子発現および染色体異常両方を同時検出する本発明の方法の性能を示している。

【図8】図8は、それぞれがヒト癌細胞系に由来する組織cDNAおよびゲノムDNA集団であって、一方は赤色で標識され、他方は緑色で標識されたもの、および橙色で標識された全ヒトゲノムDNA対照集団とのハイブリダイゼーション後の核酸マイクロアレイからのデータを示し、これらは、同一核酸マイクロアレイで遺伝子発現および染色体異常両方を同時検出する本発明の方法の性能を示している。

【図9】図9は、それぞれがヒト癌細胞系に由来する組織cDNAおよびゲノムDNA集団であって、

一方は赤色で標識され、他方は緑色で標識されたもの、および橙色で標識された全ヒトゲノムDNA対照集団とのハイブリダイゼーション後の核酸マイクロアレイからのデータを示し、これらは、同一核酸マイクロアレイで遺伝子発現および染色体異常両方を同時検出する本発明の方法の性能を示している。

【図10】図10は、それぞれがヒト癌細胞系に由来する組織cDNAおよびゲノムDNA集団であって、一方は赤色で標識され、他方は緑色で標識されたもの、および橙色で標識された全ヒトゲノムDNA対照集団とのハイブリダイゼーション後の核酸マイクロアレイからのデータを示し、これらは、同一核酸マイクロアレイで遺伝子発現および染色体異常両方を同時検出する本発明の方法の性能を示している。

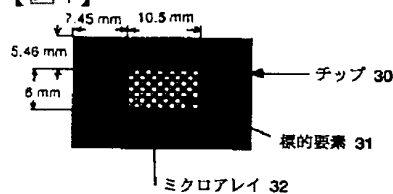
【図11】図11は、それぞれがヒト癌細胞系に由来する組織cDNAおよびゲノムDNA集団であって、一方は赤色で標識され、他方は緑色で標識されたもの、および橙色で標識された全ヒトゲノムDNA対照集団とのハイブリダイゼーション後の核酸マイクロアレイからのデータを示し、これらは、同一核酸マイクロアレイで遺伝子発現および染色体異常両方を同時検出する本発明の方法の性能を示している。

【図12】図12は、それぞれがヒト癌細胞系に由来する組織cDNAおよびゲノムDNA集団であって、一方は赤色で標識され、他方は緑色で標識されたもの、および橙色で標識された全ヒトゲノムDNA対照集団とのハイブリダイゼーション後の核酸マイクロアレイからのデータを示し、これらは、同一核酸マイクロアレイで遺伝子発現および染色体異常両方を同時検出する本発明の方法の性能を示している。

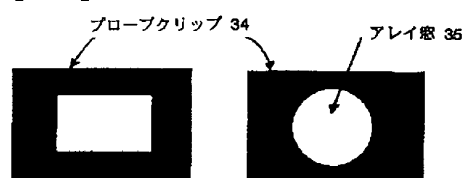
【図13】図13は、それぞれがヒト癌細胞系に由来する組織cDNAおよびゲノムDNA集団であって、一方は赤色で標識され、他方は緑色で標識されたもの、および橙色で標識された全ヒトゲノムDNA対照集団とのハイブリダイゼーション後の核酸マイクロアレイからのデータを示し、これらは、同一核酸マイクロアレイで遺伝子発現および染色体異常両方を同時検出する本発明の方法の性能を示している。

## 図面

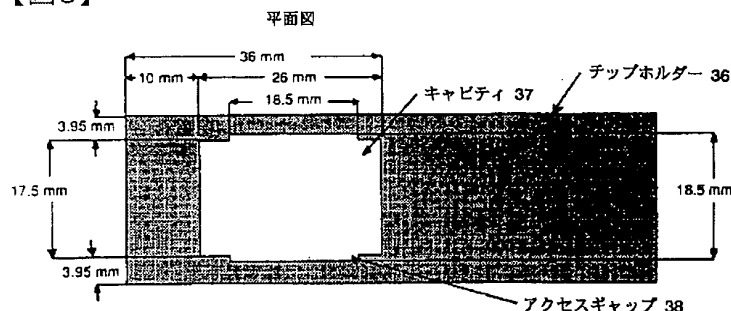
【図1】



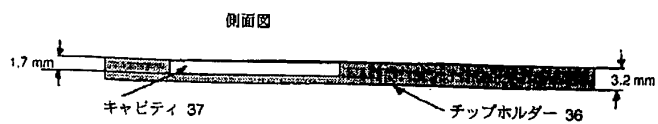
【図2】



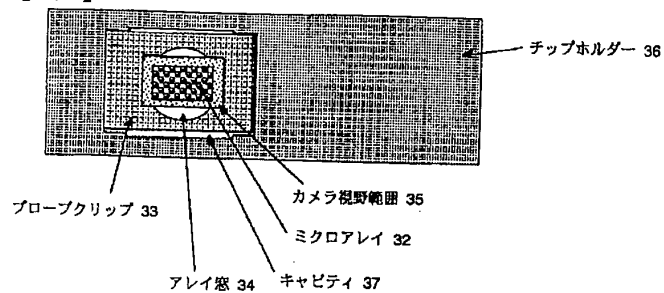
【図3】



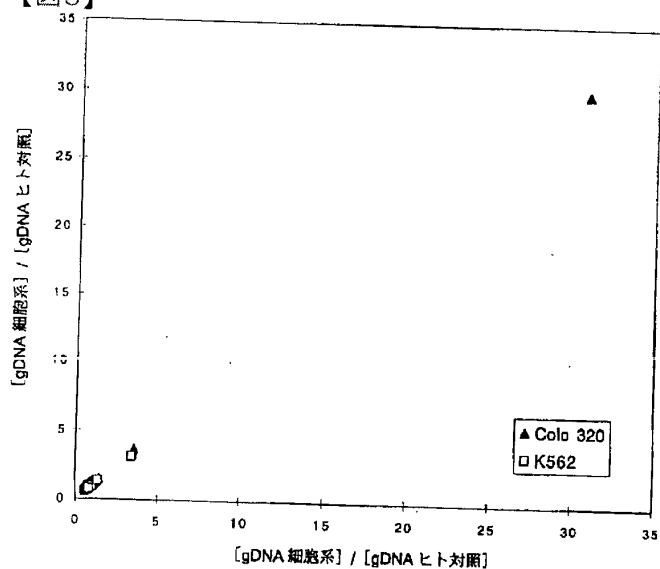
【図4】



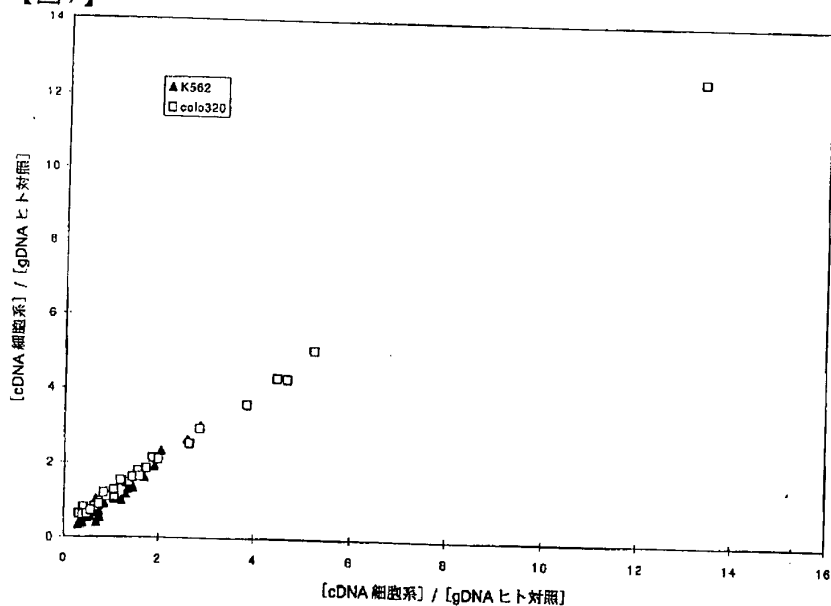
【図5】



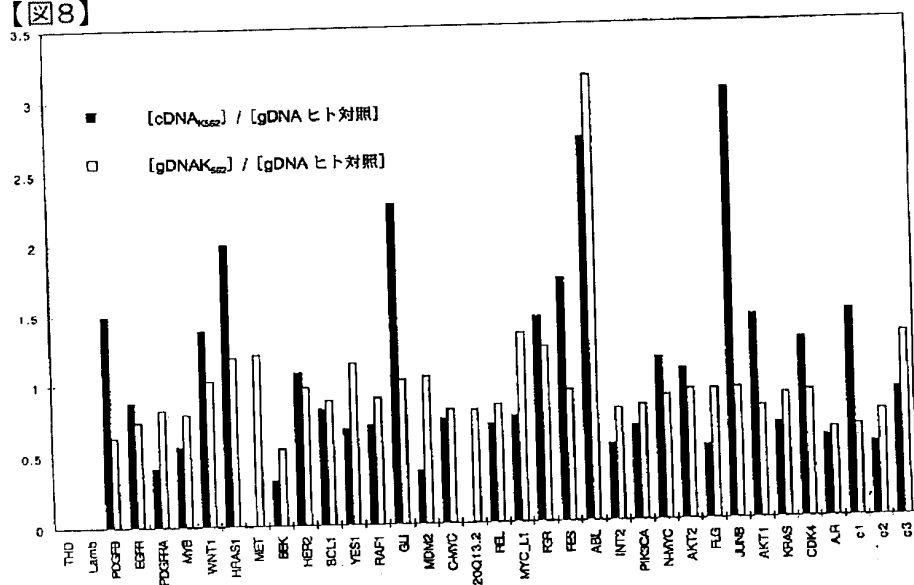
【図6】



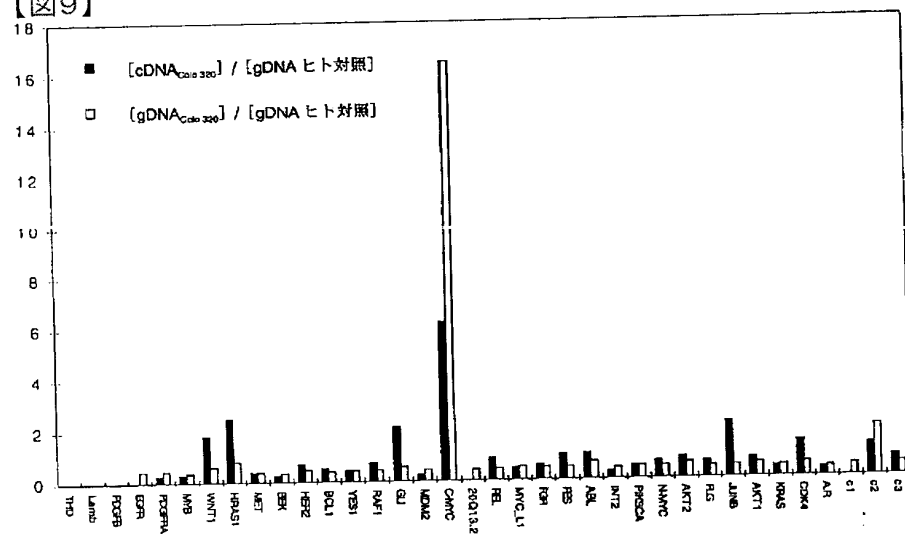
【図7】



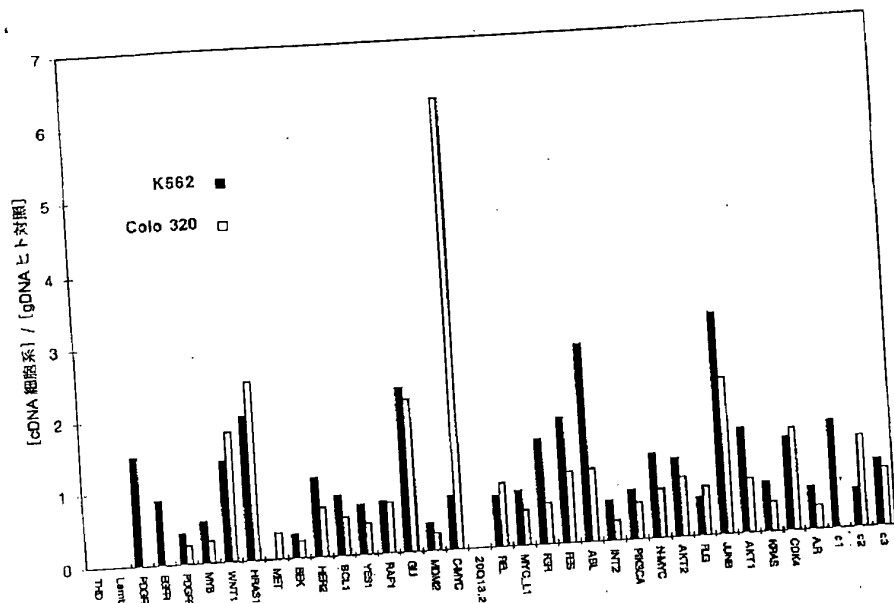
【図8】



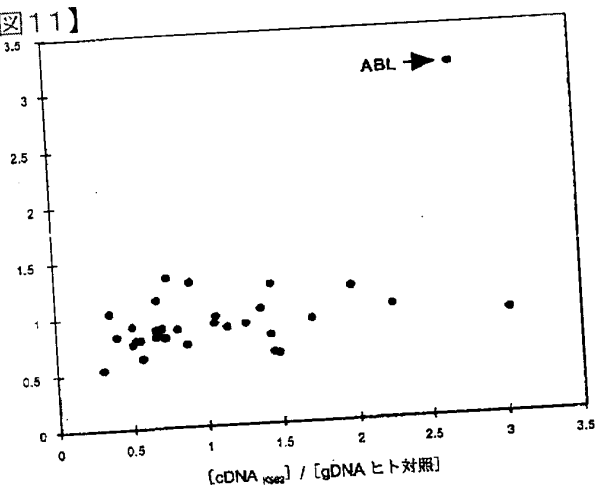
【図9】



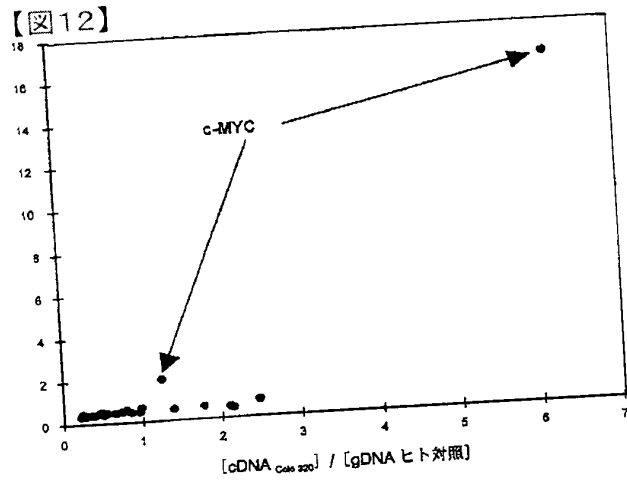
【図10】



【図11】



【図12】



【図13】

